

**Gating neuer Subpopulationen im Granulozytenscatter
mit Leukozyten-ähnlichem Phänotyp und deren
Zusammenhang zu kardiovaskulären Risikofaktoren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Marlene Kautzner

Geburtsdatum/-ort: 13.01.1993 in Annaberg-Buchholz

angefertigt an: Universität Leipzig, Herzzentrum Leipzig GmbH, Forschung und
Lehre, Kinderkardiologie

Betreuer: Prof. Dr. Attila Tárnok, Prof. Dr. Markus Löffler

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 23.10.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einführung	7
1.1 Granulozyten im Fokus	7
1.1.1 Cluster of differentiation zur Phänotypisierung	9
1.1.2 Relevanz zu kardiovaskulären Erkrankungen	9
1.2 Durchflusszytometrie	10
1.2.1 Prinzip der Methode	11
1.2.2 Anwendung der Zytometrie im klinischen Alltag	16
1.3 LIFE – „Zivilisationskrankheiten im Visier“	17
2 Aufgabenstellung	21
3 Materialien und Methoden	23
3.1 Materialien.....	23
3.1.1 Probandenauswahl	23
3.1.2 Reagenzien	23
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	24
3.1.4 Geräte	24
3.1.5 Software.....	24
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Probengewinnung	24
3.2.2 Probenaufarbeitung.....	25
3.2.3 Durchflusszytometrie	27
3.2.4 Analyse mittels FlowJo	29
3.2.5 Merkmalsanalyse	35
3.2.6 Probandenausschluss	37
3.3 Statistische Methoden.....	40
4 Ergebnisse	43
4.1 Geschlechtsabhängigkeit	43
4.2 Altersabhängigkeit.....	44
4.3 Abhängigkeit von der Waist-to-Hip Ratio (WHR)	47
4.4 Abhängigkeit vom Cholesterinspiegel	49
4.4.1 HDL	49
4.4.2 LDL	49

4.5	Abhängigkeit vom Lebensstil	50
4.5.1	Rauchstatus	50
4.5.2	Alkoholaufnahme.....	53
4.6	Abhängigkeit von arterieller Hypertonie	54
5	Diskussion	57
5.1	Bewertung der Methodik	57
5.1.1	Probandenauswahl und Merkmalsanalyse	57
5.1.2	Probenaufbereitung	59
5.1.3	Blut als Lieferant für Biomarker bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	59
5.1.4	Analyse mittels Durchflusszytometrie und manuellem Gating	60
5.1.5	Statistik	61
5.2	Bewertung der Ergebnisse	61
5.2.1	Interpretation der Gatingresultate	61
5.2.2	Überblick und Diskussion der statistischen Analyse	66
6	Ausblick	73
7	Zusammenfassung.....	75
8	Literaturverzeichnis	79
	Anlagen.....	89
	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	95
	Lebenslauf.....	97
	Danksagung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

Es gelten die internationalen Abkürzungsregelungen nach IUPAC (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) und DUDEN sowie internationale Einheiten- und Größenbezeichnungen. Einige im englischen Sprachgebrauch etablierte Fachbegriffe wurden so übernommen und auf deren unübliche deutsche Übersetzung wurde willentlich verzichtet.

APC	<u>A</u> llophycoc <u>y</u> anin
Ax	<u>A</u> lex <u>a</u>
BSA	Rinderalbumin, engl. <i>b</i> ovine <i>s</i> erum <i>a</i> lbumin
CD	engl. <i>c</i> luster of <i>d</i> ifferentiation protein
Cy	<u>C</u> yanin
CRP	<u>C</u> -reaktives <u>P</u> rotein
DPSS	engl. <i>d</i> iode pumped <i>s</i> olid <i>s</i> tate
ECD	engl. <i>e</i> nergy- <i>c</i> oupled <i>d</i> ye
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> cet <u>a</u> t
EFRE	<u>E</u> uropäische <u>F</u> onds für <u>r</u> egionale <u>E</u> ntwicklung
ESF	<u>E</u> uropäische <u>S</u> ozial <u>f</u> onds
FACS	engl. <i>f</i> lourescence <i>a</i> ctivated <i>c</i> ell <i>s</i> orting
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> s <u>o</u> thiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulich, engl. <i>f</i> orward <i>s</i> catter <i>c</i> hannel
H7	<u>H</u> ighlight 750
HLA	humanes Leukozytenantigen, engl. <i>h</i> uman <i>l</i> eucocyte <i>a</i> ntigen
HDL	Lipoprotein hoher Dichte, engl. <i>h</i> igh <i>d</i> ensity <i>l</i> ipoprotein
LDL	Lipoprotein niederer Dichte, engl. <i>l</i> ow <i>d</i> ensity <i>l</i> ipoprotein
LL	Lymphozyten-ähnliche Zellen, engl. <i>l</i> ymphocyte- <i>l</i> ike
M	<u>m</u> ännlich
ML	Monozyten-ähnliche Zellen, engl. <i>m</i> onocyte- <i>l</i> ike
NLR	Neutrophile/Lymphozyten Verhältnis, engl. <i>n</i> eutrophil to <i>l</i> ymphocyte <i>r</i> atio

OMIP	engl. <i>Optimized <u>m</u>ulticolor <u>i</u>mmunofluorescence <u>p</u>anel</i>
PB	<u>P</u> azifik <u>b</u> lau
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, engl. <i><u>p</u>eripheral <u>b</u>lood <u>m</u>ononuclear <u>c</u>ell</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i><u>p</u>hosphate <u>b</u>uffered <u>s</u>aline</i>
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
PMT	Photomultiplier
SSC	Seitwärtsstreulicht, engl. <i><u>s</u>ideward <u>s</u>catter <u>c</u>hannel</i>
TNF- α	<u>T</u> umor <u>N</u> ekrose <u>F</u> aktor <u>α</u>
V500	Horizon 500
W	<u>w</u> eiblich
WBC	Leukozyten, engl. <i><u>w</u>hite <u>b</u>lood <u>c</u>ell count</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. <i><u>w</u>orld <u>h</u>ealth <u>o</u>rganisation</i>
WHR	Hüftumfang durch Taillenumfang, engl. <i><u>w</u>aist-to-<u>h</u>ip <u>r</u>atio</i>

1 Einführung

Eine detaillierte phänotypische Charakterisierung von Granulozytensubpopulationen und deren Korrelation zu biometrischen und lebensstilrelevanten Eigenschaften ist in der Literatur kaum zu finden. Dies hat unter anderem methodische Ursachen, so wird z.B. eine Isolation von mononukleären Zellen (Monozyten, Lymphozyten) mit Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymeren (Markenname: Ficoll), bei welcher Granulozyten für die Auswertung bereits vorab ausgeschlossen werden, bevorzugt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Tárnok wurden in Standardanalysen häufig Zellen gefunden, die durchflusszytometrisch aufgrund ihrer Morphologie den Granulozyten zuzuordnen sind, aber nicht granulozytentypische Phänotypen aufweisen. Diese Zellen wurden zwar auch von anderen Arbeitsgruppen gefunden, sie sind jedoch bislang in der Literatur nicht näher beschrieben oder weitergehend betrachtet. Daher wurden für diese Arbeit aus fast 900 Blutproben von Probanden der Leipziger LIFE-Studie Vielfarben-Durchflusszytometrie-Daten nähergehend betrachtet, um die besagten Granulozytensubpopulationen erstmals detailliert zu erfassen.

Im Folgenden wird neben der Beschreibung der bisherig bekannten Funktion der Granulozyten auf die in dieser Arbeit verwendete Methodik der Durchflusszytometrie und die Beschreibung der LIFE-Studie, welche die Probanden für die analysierten Daten lieferte, näher eingegangen.

1.1 Granulozyten im Fokus

Die Granulozyten bilden den größten Anteil der in unserem Blut vorhandenen Leukozyten. Sie werden eingeteilt in die Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen. Die erstmalige Beschreibung vier unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen erfolgte 1865 durch Max Johann Sigismund Schultze (1825 – 1874) in seiner Arbeit „Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes“ [1]. Ein Meilenstein in der Geschichte der Granulozyten wurde durch Paul Ehrlich (1854 – 1915) gelegt. Er beschäftigte sich mit der Färbung und Funktion von Leukozyten und veröffentlichte 1900 eine Arbeit zur simultanen Färbung und Differenzierung von neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten [2]. 1908 wurde Ehrlich für seinen Beitrag in der Immunologie der Nobelpreis in der Kategorie Physiologie und Medizin verliehen.

Da die neutrophilen Granulozyten den Hauptteil der Leukozyten ausmachen, sind diese in ihrer Funktion besonders gut untersucht. Sie gehören zur angeborenen Immunabwehr des Körpers und reagieren besonders schnell auf Infektionen, Entzündungen und Stress. Eine hauptsächliche Funktion ist die Phagozytose von Mikroorganismen [3, S. 160].

Die Granulozyten werden durch Zytokine wie zum Beispiel TNF- α (Tumor Nekrose Faktor α) aktiviert, durch Chemotaxis an den Ort der Infektion gelockt und können mit Hilfe von Oberflächenmolekülen Erreger detektieren, binden und internalisieren. Der Abbau des Mikroorganismus erfolgt mit Hilfe verschiedener lysosomaler Enzyme (zum Beispiel Hydrolasen, Myeloperoxidasen und Defensinen), welche neben weiteren Entzündungsmediatoren wie Zytokinen in den Granula enthalten sind [4]. Die Neutrophilen zeichnen sich aufgrund ihrer vielen Enzyme und Proteine durch eine hohe Granularität aus und besitzen einen Durchmesser von ca. 12-15 μm . Mit Hilfe der Morphologie des Zellkerns können sie in die frühen stabkernigen und die reifen segmentkernigen neutrophilen Granulozyten eingeteilt werden. Granulozyten entwickeln sich im Knochenmark aus den myeloischen Vorläuferzellen unter dem Einfluss von GM-CSF (engl. *granulocyte-monocyte colony stimulating factor*) zur Vorläuferzelle für Monozyten und Granulozyten, welche sich unter dem weiteren Einwirken von G-CSF (engl. *granulocyte colony stimulating factor*) zu Granulozyten spezifizieren.

Eine besondere Rolle haben neutrophile Granulozyten neben der angeborenen Abwehrreaktion auf vor allem bakterielle Erreger in der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen, da sie an der Genese der Arteriosklerose mitwirken. Aufgrund der Relevanz für diese Arbeit wird der Zusammenhang zu kardiovaskulären Erkrankungen in Abschnitt 1.1.2 näher erläutert.

Die eosinophilen Granulozyten haben ihre Funktion vor allem in der Initiation und Verstärkung von Entzündungsreaktionen durch die Phagozytose und Präsentation von Antigenen [3, S. 163]. Dies findet insbesondere bei der Abwehr von parasitären Erkrankungen sowie bei allergischen Reaktionen statt, daher werden sie auch als Marker in diesem Bereich eingesetzt [5; 6]. Von ihrer Größe und Form ähneln sie den Neutrophilen, mit Hilfe der starken Eosinophilie der Granula, welche hauptsächlich durch das Major Basic Protein bedingt ist, ist eine Differenzierung möglich. Dieses Protein wirkt direkt zytotoxisch und auf andere proinflammatorische Zellen aktivierend.

Basophile Granulozyten sind morphologisch eher mit Lymphozyten vergleichbar. Sie sind etwas kleiner und haben eine geringere Granularität als die bereits erwähnten Granulozyten. Sie besitzen hauptsächlich Mediatoren, die für eine starke allergische Reaktion verantwortlich sind, wie Histamin, Arachidonsäure, Prostaglandine und Leukotriene. Diese bewirken vor allem eine Gefäßerweiterung mit Ödembildung sowie eine Kontraktion mit Spasmus der glatten Muskulatur. Sie besitzen hochspezifische IgE-Rezeptoren, bei deren Bindung die vasoaktiven Substanzen freigesetzt werden. Basophile Granulozyten sind damit wichtige diagnostische Parameter in der Diagnostik von Allergien [7].

Die Beschreibung der einzelnen Zellen aufgrund ihrer mikroskopisch erfassbaren Morphologie ist nur eine Möglichkeit zur Typisierung dieser. Eine weitere liegt in der Mög-

lichkeit, die molekularbiologischen Eigenschaften einer Zelle nachzuweisen, welche oft spezifisch bei einer Zellart oder Entwicklungsstufe vorkommen. Dies wird im nächsten Abschnitt anhand des CD (engl. *cluster of differentiation*) näher erläutert.

1.1.1 Cluster of differentiation zur Phänotypisierung

Verschiedene Moleküle wie Proteine oder Glykoproteine, die entweder membrangebunden oder im Zytoplasma von Zellen vorkommen, können dank der Herstellung von monoklonalen Antikörpern mit diesen markiert werden. Dabei erkennen die Antikörper einen definierten Strukturbereich der Antigene (Epitop) und binden an diese. Um die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe qualitativ und quantitativ zu bestimmen, können beispielsweise Immunoassays durchgeführt werden, in denen der Komplex durch eine signalgebende Markierung nachgewiesen wird. Hierbei kann man beispielsweise fluoreszierende oder chemolumineszierende chemische Gruppen an den Antikörper binden. Bei der Fluoreszenz kommt es nach Anregung mit Licht, bei der Chemolumineszenz nach spezifischer chemischer Reaktion zur Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge.

Erkennen die eingesetzten Antikörper die gleichen Strukturen, werden sie in internationalen Workshops dem cluster of differentiation zugeordnet. Die daraus resultierende CD-Nomenklatur ist international gültig und vereinfacht die globale wissenschaftliche Kommunikation. Seit der letzten *Human Leukocyte Differentiation Antigens* (HLDA) Konferenz 2016 sind über 400 CD-Antigene dokumentiert [8].

Bei den CD-Molekülen handelt es sich um Rezeptoren mit unterschiedlichsten Funktionen wie zum Beispiel Antigenerkennung zur Zellkommunikation oder enzymatischer Aktivität. Aufgrund der Bindung von Antikörpern an die CD-Moleküle und der Kopplung von fluoreszierenden Farbstoffen an spezifische Antikörper ist zur Analyse der Oberflächenproteine die Methodik der Durchflusszytometrie (siehe 1.2.1) anwendbar.

1.1.2 Relevanz zu kardiovaskulären Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind laut statistischem Bundesamt neben Krebserkrankungen führende Todesursache in Deutschland und damit von enormer Bedeutung für die Gesellschaft und die medizinische Forschung. Im Jahr 2015 waren 38,5 % der Sterbefälle in Deutschland auf Erkrankungen des Kreislaufsystems wie die arterielle Hypertonie, die ischämische Herzkrankheit und den damit verbundenen Myokardinfarkt sowie auch zerebrovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen [9]. Die Pathologie hinter diesen Krankheiten ist hauptsächlich die Arteriosklerose, welche durch den westlichen Lebensstil gefördert wird. Dieser ist vor allem geprägt durch ungenügend körperliche Aktivität, ungesunde Ernährung (einseitig, kohlenhydrat- und lipidreich, ballaststoffarm), erhöhten Alkoholkonsum und einen positiven Rauchstatus. Dies endet häufig in einem meta-

bolisch-vaskulären Syndrom aus Insulinresistenz mit Diabetes mellitus, Adipositas mit viszeraler Fettverteilung (erhöhtem Taillenumfang), Dyslipidämie und arterieller Hypertonie [10].

Die Leukozyten spielen in der Entstehung der Arteriosklerose eine entscheidende Rolle. Die Zellen wandern durch Dysfunktion des Endothels in den Subendothelialraum und bewirken hier eine Entzündungsreaktion. Bekannt sind hier vor allem die Makrophagen, die als Schaumzellen in den *fatty streaks* neben den glatten Muskelzellen zu finden sind. In Arteriosklerosemodellen, in denen vor allem die Frühphase der Plaqueentstehung untersucht wurde, fand man jedoch auch eine hohe Anzahl von Granulozyten, welche in der Gefäßwand akkumulieren und ein Zeichen für die systemische Entzündungsreaktion darstellen [11; 12].

Neben der Prophylaxe dieser degenerativ-entzündlichen Gefäßprozesse sind vor allem eine frühe Erkennung und damit auch eine rechtzeitige Behandlung von besonderem Interesse. Aus diesem Grund gibt es in der medizinischen Forschung zahlreiche Studien über molekulare und zelluläre Biomarker zur Frühidentifikation eines kardiovaskulären Risikos. Aufgrund des bestehenden Zusammenhangs zwischen Entzündung und Gefäßveränderungen wurde besonders in Studien der letzten Jahre immer mehr Wert auf inflammatorische Marker gelegt. In den Anfängen wurden hierfür zum Beispiel das C-reaktive Protein (CRP) oder der WBC (engl. *white blood cell count*) für die Anzahl an Leukozyten herangezogen [13–16]. Erhöhte Werte stellen einen Prädiktor für die Entwicklung eines metabolisch-vaskulären Syndroms [17] und damit ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko dar [18]. Eine bessere Aussagekraft hierfür erhält man jedoch durch eine spezielle Analyse, welche Subtypen von Leukozyten einen Zusammenhang zu kardiovaskulären Ereignissen aufweisen [19; 20], wie in neueren Studien festgestellt werden konnte. Hierbei fällt auf, dass vor allem eine hohe Anzahl an neutrophilen Granulozyten und eine geringe Anzahl an Lymphozyten stark mit Arteriosklerose an den Koronararterien des Herzens korrelieren. Aufgrund dieser neueren Erkenntnisse kann man das Neutrophile/Lymphozyten Verhältnis zur Vorhersage für das kardiovaskuläre Risiko eines Patienten heranziehen [21].

1.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine spezielle Methode, um einzelne Zellen genauer zu untersuchen und zu charakterisieren, beziehungsweise gegebenenfalls zu sortieren. Hierbei können verschiedenste Merkmale einer Zelle gleichzeitig qualitativ und quantitativ erfasst werden. Mit Hilfe von molekularer Zellphänotypisierung kann es dabei um Oberflächenmoleküle, wie die genannten CD-Rezeptoren, oder aber um intrazelluläre Strukturen, wie zum Beispiel DNA oder intrazellulärer Zytokine gehen. Außerdem wird die Zelle anhand ihrer Morphologie analysiert, d.h. anhand der Größe und Granularität

[22]. Das Verfahren findet vor allem in der Routinediagnostik der Klinik sowie in der Grundlagenforschung der Zellbiologie und Immunologie Anwendung [23]. Im Folgenden werden das Messprinzip sowie Anwendungsbeispiele dargestellt.

1.2.1 Prinzip der Methode

Das Messprinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Erfassung optischer Signale. Zunächst werden die Zellen einer Suspension einzeln hintereinander (wie bei einer Perlenschnur) durch hydrodynamische Fokussierung aufgereiht und mit monochromatischem Licht angeregt. In der Regel werden mehrere Lichtquellen eingesetzt, welche typischerweise aus einem roten, blauen und ultravioletten Laser bestehen [24, S. 6].

Durch Auftreffen des Lichts auf die Zellen wird ein Teil dessen gestreut und auch absorbiert. Unterschieden wird zwischen dem Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *forward scatter channel*), welches grob betrachtet Aussagen über die Größe der jeweiligen Zelle zulässt, und dem Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. *sideward scatter channel*), welches über die Granularität und damit die Komplexität des Inhalts einer Zelle definiert ist. Das FSC wird nahezu im Winkel von 0° bzw. 180° und das SSC im 90° Winkel dazu gestreut. Aus der grafischen Darstellung von FSC gegen SSC lassen sich schon erste Aussagen über die Morphologie und damit auch ein Unterscheiden der Leukozytenhauptzelltypen einer Blutprobe erreichen. Eine Unterscheidung der Leukozyten mittels Durchflusszytometrie in ihre drei Subpopulationen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) wurde schon in den 1980er Jahren beschrieben [25; 26]. Die Detektion des gestreuten Lichts erfolgt entweder über Photomultiplier (PMT) oder Photodioden, welche die optischen Signale jeder einzelnen, den Laserstrahl passierenden Zelle in elektrische Impulse konvertieren [24, S. 17]. Dieser Signalimpuls weist eine Höhe (H, engl. *height*), Breite (W, engl. *width*), eine Flugzeit (TOF, engl. *time of flight*) und einen integrierten Bereich (A, engl. *area*) auf (Abbildung 1). Die kombinierte Darstellung zweier dieser Signale erlaubt die Unterscheidung von Ereignissen, welche der gleichzeitigen Passage von zwei Zellen (Doubletten, koinzidente Zellen) zuzuordnen sind (Abbildung 1, B), zu Ereignissen, die durch eine große Einzelzelle entstanden sind (Abbildung 1, A) [27, S. 612; 28].

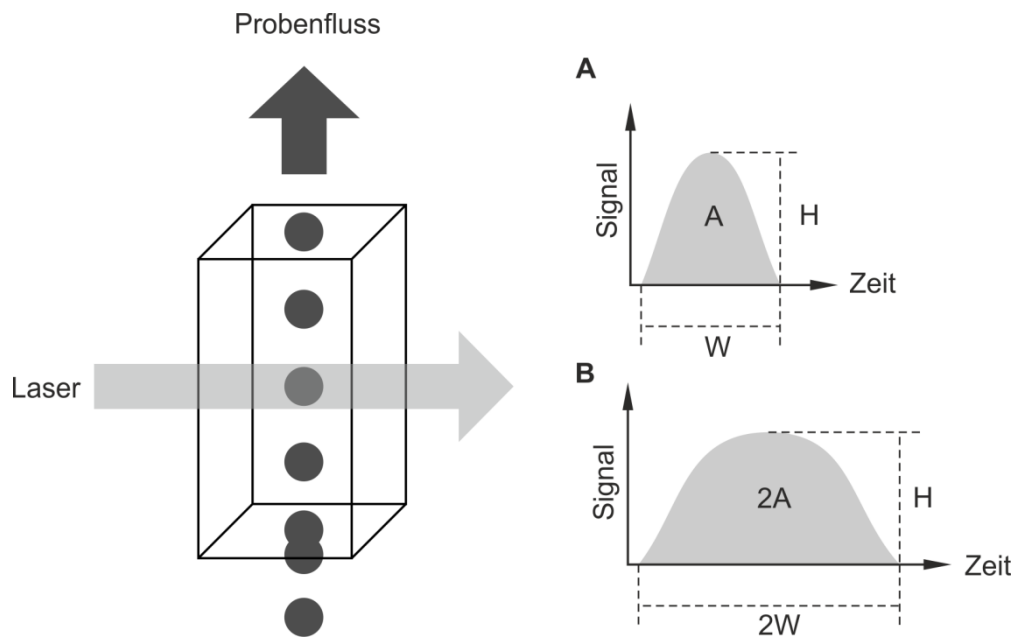


Abbildung 1: (A) Signaleigenschaften bei Anregung einer Zelle durch den Laser sowie exemplarische Darstellung von Doubletten (B) inklusive der Signaleigenschaften dieser bei Passieren des Lasers. Die Abkürzungen W, H und A stehen dabei für Breite (engl. *width*), Höhe (engl. *height*) und Fläche unter der Kurve (engl. *area*). Abbildung nach [24, S. 14].

Neben dem Streulicht wird auch das emittierte Fluoreszenzlicht im Winkel von 90° detektiert. Fluoreszenz beschreibt eine kurz andauernde Lichtemission von Partikeln, welche durch Anregung mittels energiereicher Strahlung erzeugt wird. Dies kann durch Autofluoreszenz oder eingebrachte Fluoreszenzfarbstoffe an bzw. in den Zellen auftreten. Die Fluoreszenzfarbstoffe können dabei kovalent an monoklonale Antikörper gebunden werden, welche wiederum an Oberflächenmoleküle der Zelle binden. Durch eine erhöhte Anzahl an gebundenen Antikörpern, also einer erhöhten Anzahl an Oberflächenmolekülen, steigt die Intensität des fluoreszierten Lichtes. Fluoreszenzfarbstoffe können auch in eine Zelle eindringen und zum Beispiel in die DNA einer Zelle interkalieren; die Intensität nimmt in diesem Fall mit dem DNA-Gehalt der Zelle zu.

Die Auswahl der geeigneten Farbstoffe hängt von deren Emissionsspektrum und vom eingesetzten Laser ab, da unterschiedliche Farbstoffe verschiedene Anregungsbereiche aufweisen können [24, S. 6]. Einige Farbstoffe weisen jedoch auch das gleiche Anregungsspektrum auf, aber unterschiedliche Emissionsspektren (*Stokes-Verschiebung*). Durch diesen Effekt kann bei der Mehrfarbenfluoreszenzanalyse auf die Anregung durch unterschiedliche Wellenlängen und damit evtl. auf den Einsatz mehrerer Laser verzichtet werden [24, S. 11].

In Abbildung 2 ist der schematische Aufbau eines Durchflusszytometers dargestellt. Dichroitische Filter sowie verschiedene Bandpassfilter, welche nur Licht bestimmter Wellenlängen passieren lassen, werden für die optische Trennung der Emissionsspektren der verschiedenen Farbstoffe eingesetzt [27, S. 32]. Die für die Detektion einge-

setzten Photomultiplier werden mit zunehmender Wellenlänge des fluoreszierten Lichts aufsteigend nummeriert (FL 1, FL 2, FL 3...). Dadurch können in nur einer Messung mehrere Merkmale erfasst werden, vorausgesetzt, die Merkmale sind über verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe markiert.

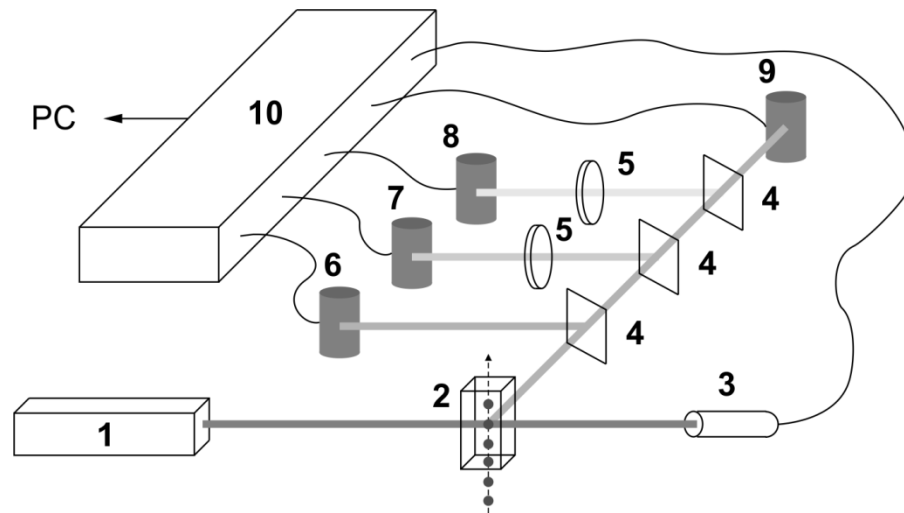


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers nach [27, S. 30]. (1) Laser (2) Messkammer (3) Photodiode für FSC, engl. *forward scatter channel* (4) dichroitische Filter (5) Bandpassfilter (6) Photomultiplier (PMT) für SSC, engl. *sideward scatter channel* (7) PMT für FL 1 (8) PMT für FL 2 (9) PMT für FL 3 (10) Analog-Digital-Wandler (PC) Computer.

Um die Anzahl der analysierten Eigenschaften eines Messvorgangs zu erhöhen, können auch mehrere Laser eingesetzt werden. Eine Möglichkeit stellt die kollineare Laser-Einkopplung dar. Dabei treffen alle Laser gleichzeitig auf die Zelle und regen diese an, was den Nachteil mit sich bringt, dass die verwendeten Farbstoffe sich in ihrem Emissionsspektrum unterscheiden müssen. Eine Alternative stellt die räumlich getrennte Laser-Einkopplung dar, bei der die Zelle verschiedene Laser hintereinander passiert. Hierbei können auch Farbstoffe gleicher Emission eingesetzt werden, mit der Einschränkung, dass sie jeweils nur von einem Laser intensiv angeregt werden [27, S. 37].

Bei der Mehrfarbendurchflusszytometrie werden mehrere Farbstoffe von einem Laserstrahl angeregt und analysiert. Ein Problem dieser Methode besteht in einer Überlappung der Emissionsspektren der eingesetzten Farbstoffe (siehe Abbildung 3). Um dieses Problem zu lösen, kann mit Hilfe von Filtern nur ein ausgewählter Spektralbereich des emittierten Signals analysiert werden. Eine vollständige Abgrenzung der einzelnen Fluoreszenzbereiche ist jedoch nicht möglich. Somit kommt es zu zusätzlichen, ungewünschten Signalen an den einzelnen Detektoren. Ein typisches Beispiel einer solchen Überlappung bieten die Farbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) (siehe Abbildung 3), wobei vor allem FITC einen hohen Anteil an Fluoreszenz im Spektralbereich von PE-Detektoren aufweist [29]. Um eine falsche Zuordnung der

Farbstoffe und damit eine fehlerhafte Auswertung der gesamten Messung zu verhindern, benötigt es einer Korrektur, welche mathematisch erreicht wird. Der Vorgang der rechnerischen Elimination der unerwünschten Fluoreszenzsignale vom echten Fluoreszenzsignal wird als Kompensation bezeichnet [30]. Eine korrekte Kompensation ist wichtig, um negative Zellen (ohne Fluoreszenz) von positiven Zellen (mit gebundenem Farbstoff und damit fluoreszierend) auch mit schwach exprimierten Antigenen zu differenzieren. Jedoch sollte auch eine Überkompensation vermieden werden, da sonst mögliche positiv fluoreszierende Signale übersehen werden können. Folglich wird es bei zunehmender Anzahl an eingesetzten Farbstoffen schwerer und komplexer, die richtige Kompensationsmatrix zu finden. Hierbei wird erst die Probe jeweils mit jedem Farbstoff einzeln analysiert und die Überlappung in die nicht gefärbten Kanäle gemessen. Diese sind anschließend zu subtrahieren. Zur Kontrolle der Kompensation können jeweils alle Farbstoffe untereinander paarweise in Zweiparameterhistogrammen gegenübergestellt werden. Um dies rechnerisch zu verarbeiten, sind Matrixkalkulationen erforderlich [31; 32], welche meist vollständig automatisiert per Voreinstellung des Herstellers elektronisch über die Software des Geräts erstellt werden.

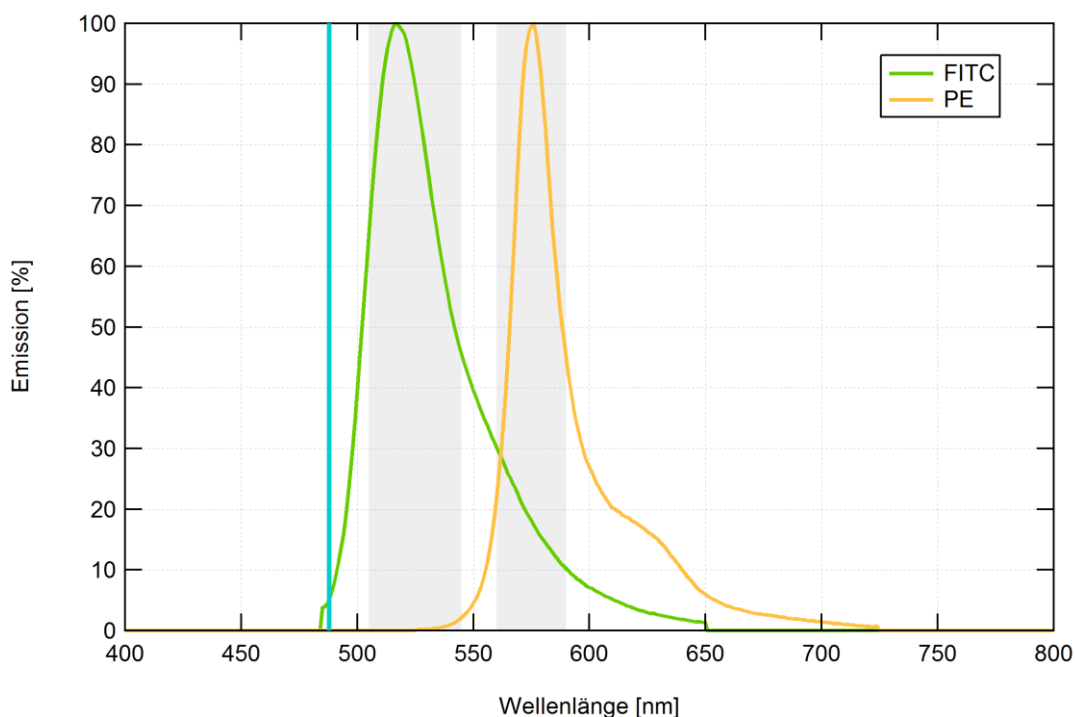


Abbildung 3: Fluoreszenzspektren von FITC (Fluoresceinisothiocyanat, grüne Linie) und PE (Phycoerythrin, orange Linie) mit Überlappung des jeweiligen Emissionsbereichs und grau unterlegtem Spektralbereich der Lichtdetektion (Filtereigenschaften des Zytometers Navios Beckman Coulter für FITC bei 525BP40 und für PE bei 575BP30). Anregungswellenlänge des Lasers bei 488 nm (blaue Linie). Erstellt mit Igor Pro 6 nach [33].

Durch Analog-Digital-Wandler werden die erfassten binären Daten in einem standardisierten sogenannten Listmode-File zur Auswertung an einen angekoppelten Computer gesendet [34, S. 239]. An diesem kann dann mittels verschiedenster Software die Verarbeitung der zytometrisch erhobenen Daten erfolgen. Eine solche Auswertesoftware ist zum Beispiel FlowJo, mit deren Hilfe einzelne Subpopulationen identifiziert und charakterisiert werden können. Die Darstellung eines einzelnen gemessenen Events (Ereignis), das heißt einer einzelnen Zelle kann als Punkt in sogenannten Dotplots (Zweiparameterhistogrammen) erfolgen, um die Relation zweier unterschiedlicher Eigenschaften einer Zelle visualisieren zu können [24, S. 22]. Mit Hilfe der Lage bezüglich der jeweiligen Achse können die Eigenschaften der Zellen beschrieben werden. Dies wird exemplarisch an Abbildung 4 erläutert. Es gibt Ereignisse, die eine hohe Intensität an PE-Cy5.5 (Phycoerythrin-Cyanin 5.5) aufweisen. Diese Zellen besitzen also viel CD38, welches mit dem genannten Farbstoff nachgewiesen wird; man bezeichnet sie als $CD38^+$. Ereignisse, die eine geringe Fluoreszenzintensität in diesem Bereich aufweisen, haben kaum PE-Cy5.5-gekoppelte Antikörper gebunden, besitzen also kaum CD38 an ihrer Oberfläche und werden daher $CD38^-$ bezeichnet. Eine weitere mögliche Beschreibung kann durch eine Einteilung in hohe (*high*), mittlere (*mid*) und geringe (*low*) Intensität vorgenommen werden.

Für die Analyse bestimmter Zellpopulationen werden in den Dotplots die Zelltypen aufgrund der Lage und damit der Korrelation der dargestellten Eigenschaften eingegrenzt. Der Vorgang des Eingrenzens wird als Gating bezeichnet und ein solches Auswertefenster als Gate (siehe Abbildung 4). In der darauffolgenden Auswertung werden nur solche Ereignisse berücksichtigt, welche innerhalb des eingegrenzten Bereiches liegen [24, S. 25]. Mit Hilfe dieser Strategie können in der weiteren Datenauswertung Ereignisse populationsbezogen analysiert werden.

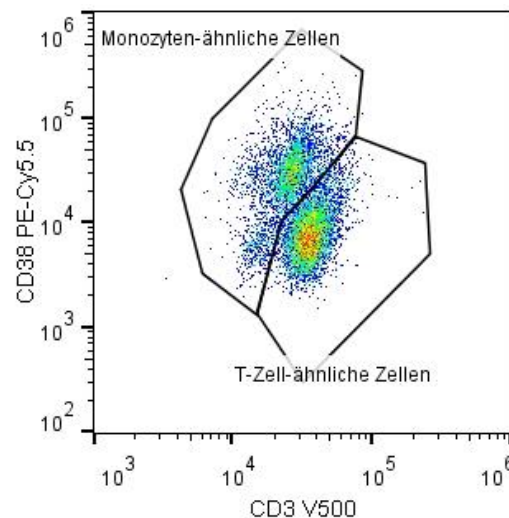


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung eines Dotplots mit den zu untersuchenden Eigenschaften von CD3 und CD38. Ein Punkt steht für ein Ereignis und damit eine Zelle. Mit Hilfe der zwei manuell angefertigten Gates können zwei Populationen unterschieden werden. Mit Hilfe der Färbung wird eine unterschiedliche Dichteverteilung der Ereignisse und damit der Zellen dargestellt, wobei diese von rot über grün zu blau abfällt.

1.2.2 Anwendung der Zytometrie im klinischen Alltag

Die Durchflusszytometrie ist aus der Diagnostik vieler Teilbereiche der Medizin nicht mehr wegzudenken. Des Weiteren findet sie zum Beispiel auch breite Anwendung in der biotechnologischen Prozesssteuerung, wie in Brauereien oder Kläranlagen. Im Folgenden sollen nur medizinische Anwendungen im Bereich der Immunologie betrachtet werden.

In der Medizin hat die Durchflusszytometrie einen großen Stellenwert zum Beispiel in der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Immundefekten erzielt [35; 36]. Eine schnelle Diagnosestellung führt zu einer frühen Erkennung der Defekte und damit zu einer Therapieeinleitung, noch bevor schwere Infekte auftreten [36]. In diesem Bereich ist auch die zytometrische Analyse der Funktionsparameter einer Zelle, wie der Phagozytose, als auch verschiedener Enzymaktivitäten, von Interesse [37]. Darüber hinaus wird die Durchflusszytometrie in der Erkennung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt, wie zum Beispiel bei der qualitativen und quantitativen Erfassung von HLA-B27 bei ankylosierender Spondylitis [38].

Die Immunphänotypisierung findet auch in der Infektiologie, vor allem in der Diagnostik und im Monitoring von HIV-Patienten Anwendung, wobei die quantitative Erfassung von CD4⁺ T-Zellen für den Abwehrstatus und die Therapieeinleitung bisher im Vordergrund stand. Neueste Erkenntnisse erachten die Relevanz dieser Zellzahl für die Therapieindikation jedoch als weniger wichtig [39].

Neben vielen weiteren Einsatzgebieten gilt es auch die Hämatologie zu nennen, da besonders bei Leukämien und Lymphomen eine Phänotypisierung der entarteten Zellen für Diagnostik und Therapieansatzpunkte von Interesse sind [40]. Der Vorteil besonders geringe Mengen an speziellen Zellen zu erfassen, ist in der Beurteilung des Therapieerfolgs von großer Bedeutung [41].

Das Aufzählen der hier nur ausschnittsweise genannten Anwendungsgebiete der Durchflusszytometrie zeigt das große Potential dieser Methodik. Um dieses Potential weiter nutzen zu können, sollte man darauf abzielen, weitere Zusammenhänge zwischen bestimmten Zellarten und Erkrankungen zu finden. Durch eine Analyse dieser Zellpopulationen könnte dann beispielsweise frühzeitig eine Erkrankungsneigung erkannt und dieser gegengesteuert werden.

1.3 LIFE – „Zivilisationskrankheiten im Visier“

Die in dieser Arbeit vorzustellenden Ergebnisse beruhen auf Daten aus der LIFE-Studie. Diese Studie ist eine populationsbasierte Kohortenstudie, welche vom Leipziger Forschungszentrum für Zivilisationserkrankungen durchgeführt wird. Das Studienkonzept wurde 2008 entworfen und konnte ab August aus Mitteln der Europäischen Union (32,3 Millionen Euro aus dem sächsischen EFRE-Programm (Europäische Fonds für regionale Entwicklung); 2,1 Millionen Euro ESF (Europäische Sozialfonds) für Nachwuchsforscher) und des Freistaates Sachsen (5,7 Millionen Euro) gefördert werden [42]. Nachdem 2010 die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig das LIFE-Studienkonzept freigab, wurde zunächst mit einer Pilotstudie mit 400 freiwilligen Teilnehmern begonnen. In dieser Pilotphase wurden die Abläufe und Protokolle für die Hauptstudie getestet und optimiert. Die Patientenrekrutierung der Hauptstudie begann im August 2011 und wurde im November 2014 erfolgreich mit einer Gesamtzahl von über 20.000 Teilnehmern abgeschlossen. Die LIFE-Studie gliedert sich auf in verschiedene Kohorten: eine Leipziger Bevölkerungsstudie mit 10.000 Erwachsenen zur Erhebung des Populationsquerschnittes (LIFE-Adult) und verschiedene Kohorten mit Krankheitsbezügen, wie zum Beispiel Gefäßerkrankungen und Herzinfarkt, Depression und Kopf- und Halstumore. Die für diese Arbeit verwendeten Zytom-Daten stammen alle von Probanden aus der LIFE-Adult Kohorte.

Die Durchführung der LIFE-Studie ist weltweit eine der ersten dieser Art und Größenordnung. Die wichtigsten Ziele der Studie beinhalten die Beschreibung von Prävalenzen und Inzidenzen von häufigen Zivilisationskrankheiten, die Untersuchung des Einflusses von Genetik und Lebensstil auf diese, sowie in einer noch folgenden Längsschnittuntersuchung die Identifizierung neuer Biomarker zur Früherkennung, Optimierung der Therapie und Vorhersage des Behandlungserfolgs.

Die Probandenrekrutierung von LIFE fand in Kooperation mit dem Einwohnermeldeamt von Leipzig statt. Alters- und geschlechtsstratifiziert wurden zufällig 10.000 Bewohner ausgewählt. Das Alter der Hauptkohorte wurde auf 40-79 Jahre festgelegt, jedoch wurden zusätzlich auch junge Erwachsene im Alter von 18 bis 39 Jahren mit eingeschlossen (Abbildung 5).

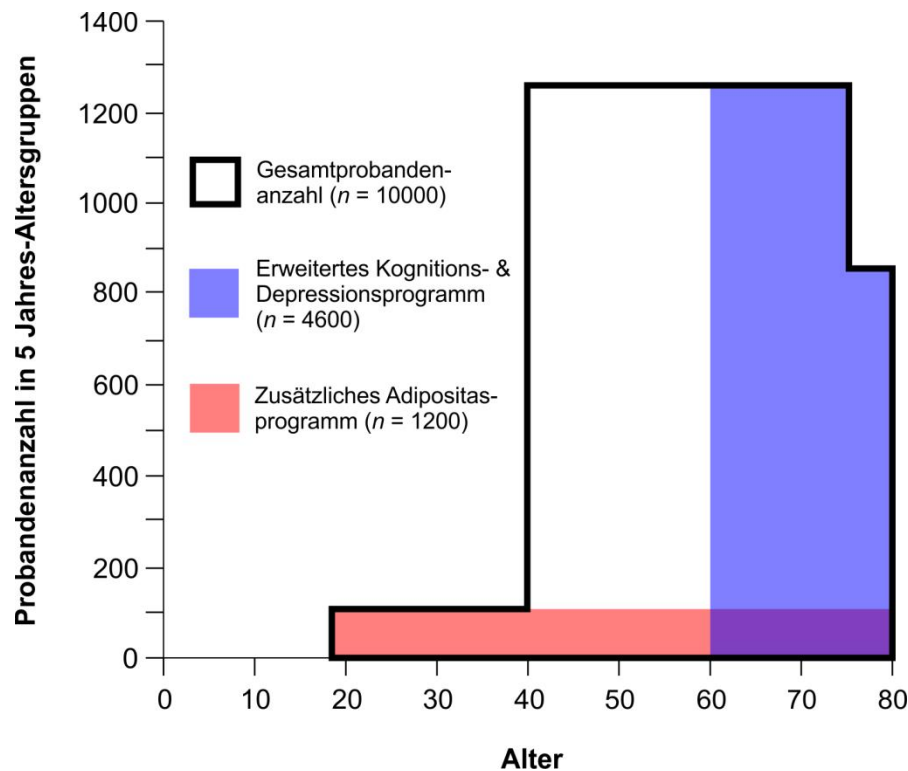


Abbildung 5: Übersicht über das LIFE-Adult Studiendesign mit Verteilung der Probanden in 5 Jahres-Altersgruppen. Abbildung nach [42].

Zur Erhebung und Gewinnung von Stammdaten wie zum Beispiel Alter und Geschlecht, Lebensstilgewohnheiten und der medizinischen Anamnese wurden alle Probanden nach einem standardisierten Basisprogramm untersucht und befragt, welches insgesamt 5 bis 6 Stunden dauerte. Inhalte waren Administration (Empfang, Verpflegung, ärztliches Abschlussgespräch; ca. 1 Stunde), apparative Untersuchungen (unter anderem Anthropometrie, Blutabnahme, Urinuntersuchung, Blutdruckmessung, Carotissonographie, Intima-Media-Dicke, Echokardiographie, oraler Glukosetoleranztest, Ruhe-EKG; ca. 2 Stunden und 40 Minuten), sowie persönliche Interviews und computergestützte Fragebögen (zum Beispiel Lebensstil, medizinische Anamnese, Demenz/Kognition; ca. 3 Stunden). Zusatzprogramme für Probanden mit einem Alter von über 65 Jahren beinhalteten ein MRT (Magnetresonanztomographie) des Schädels zur Beurteilung von strukturellen Veränderungen inklusive Tests zur Neurokognition, sowie die Durchführung eines Elektroenzephalogramms mit Analyse der Vigilanzregulation.

Zur Studienteilnahme gehörte auch eine Einwilligung in die Freigabe der Daten für weiterführende Forschungszwecke im Rahmen der LIFE-Studie. Die Biomaterialien wurden zum Großteil in einer Biobank auf Langzeit eingelagert und zusätzlich zur Direktanalyse (unter anderem Koagulationstest, Leukozyten-Phänotypisierung, Genomanalyse) in die entsprechenden Labore weitergeleitet.

Gemessen an der Anzahl der eingeladenen Probanden lag die Teilnehmerrate an der LIFE-Adult-Studie bei 33 %. Abgesagt haben 30 %, die weiteren 37 % haben sich nach mehrmaligem Anfragen von LIFE nicht zurückgemeldet [42].

2 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Beschreibung Leukozyten-ähnlicher Zellen im Granulozytenscatter, welche bisher nicht in der Literatur zu finden sind, und in der Entwicklung einer Gatingstrategie zur durchflusszytometrischen Erfassung dieser. Dabei werden folgende vier Zellpopulationen mit neuen Phänotypen im Granulozytenscatter beschrieben:

Lymphozyten-ähnliche Zellen (LL, engl. *lymphocyte like*):

LL1: CD3⁺, CD16/56⁺, CD45⁺, SS-H^{mid-high}

LL2: CD3⁺, CD38^{low}, CD8⁺, CD4⁻, CD16/56⁺, CD45⁺, SS-H^{mid-high}

LL3: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻, CD16/56⁺, CD45⁺, SS-H^{mid-high}

Monozyten-ähnliche Zellen (ML, engl. *monocyte like*):

ML: CD3⁻, CD38⁺, CD14⁺, CD4⁻, CD16⁺, CD45⁺, SS-H^{mid-high}.

Die Verteilung dieser Zellen sowie das Neutrophile/Lymphozyten-ähnliche-Zellen Verhältnis für die Populationen LL2 und LL3 in der Allgemeinbevölkerung soll analysiert werden. Basierend auf vorhandenen Literaturdaten zu bekannten Subpopulationen wurden folgende drei Hypothesen aufgestellt:

1. Die Granulozytensubtypen korrelieren mit dem Alter und Geschlecht der LIFE-Adult Kohorte.
2. Die Granulozytensubtypen zeigen einen Zusammenhang zu den anamnestisch erfassten Lebensstilmerkmalen Alkohol- und Zigarettenkonsum der LIFE-Adult Kohorte.
3. Die Granulozytensubtypen korrelieren mit ausgewählten kardiovaskulären Risikofaktoren (WHR, HDL, LDL, arterielle Hypertonie) der LIFE-Adult Kohorte.

Wenn Hypothese drei bestätigt wird, soll des Weiteren diskutiert werden, ob die neu identifizierten, phänotypisierten Granulozytensubpopulationen als Biomarker zur Früherkennung von kardiovaskulären Erkrankungen dienen können.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Probandenauswahl

Für die zytometrische Analyse wurden Blutproben der LIFE-Adult Kohorte im Zeitraum von Februar 2011 bis August 2014 untersucht. 963 aller mit einem 10-Farbprotokoll [43] gemessenen Proben wurden zur Gating-Auswertung und damit zur Untersuchung der Aufgabenstellung in dieser Arbeit herangezogen. Die geschlechtsspezifische Verteilung der zur Auswertung herangezogenen Probanden liegt bei M (männlich) : W (weiblich) 47 % : 53 %. Dieses Verhältnis konnte durch eine alters- und geschlechtsstratifizierte Auswahl erreicht werden, indem von den bis zu 20 Blutproben pro Tag durchschnittlich 8 anhand der Stammdaten (Geschlecht und Alter) selektiert wurden. Folglich wurden mindestens 50 Personen jeder Altersdekade in der Hauptkohorte mit dem Alter von 40-79 Jahren (insgesamt für beide Geschlechter) analysiert.

3.1.2 Reagenzien

- Lysepuffer: pH = 7,4 (0,15 M Ammoniumchlorid, NH_4Cl (Carl Roth GmbH & Co., P726.1); 0,01 M Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3 (Carl Roth GmbH & Co., 6885.2); 1 mM Ethylendiamintetraacetat, EDTA (SIGMA ALDRICH Chemie GmbH ED4SS))
- 0,5 % BSA (Rinderalbumin, engl. *bovine serum albumin*) (Carl Roth GmbH & Co., 3737.2) in Dulbecco's PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. *phosphate buffered saline*) (PAA Laboratories, H31-002), pH = 7,4
- 0,5 % Paraformaldehyd in PBS, pH = 7,4 Paraformaldehyd (Carl Roth GmbH & Co., 0335.2), gefiltert durch einen 0,45 μm Filter
- Monoklonale Antikörper der Firmen Beckman Coulter (Pasadena, USA) und Becton-Dickinson Labware (BD: NJ)

Standardlösungen und Beadlösungen zur Überprüfung der Gerätestabilität:

- Kalibrierung des Durchflusszytometers mit Hilfe von Mikrobeads (FlowCheck Pro Fluorospheres, 3 x 10 ml, Beckman Coulter, A63493, Pasadena, USA; Rainbow Calibration Particles, 8 peaks (3,0-3,4 μm) Sphero™ brand beads) (422903, BioLegend, San Diego, USA)
- Ausrichtung der Laser mit Hilfe von FlowCheck Pro Beads (Beckman Coulter, Pasadena, USA)

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

- Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg)
- Pipettenspitzen (Dr. Ilona Schubert-Laborfachhandel, Leipzig)
- FACS (engl. *fluorescence activated cell sorting*) Röhrchen, 5 ml (Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht)
- 50 ml Falcon Tubes (Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht)

3.1.4 Geräte

- Zentrifuge Rotana 96RC, 20 cm Durchmesser Rotor (Hettich Kirchlengern)
- Hämatologie Analysator XN-9000 (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt)
- Zytometer Navios Beckman Coulter, Pasadena, USA

3.1.5 Software

- Navios Software Version 1.2
- FlowJo V.10.0.7 Tree Star
- Microsoft Office Excel 2010
- IBM SPSS Statistics 21
- CorelDRAW X4
- Igor Pro 6

3.2 Methoden

3.2.1 Probengewinnung

Die Entnahme der Blutproben wurde am jeweiligen Morgen der Probandenuntersuchung von 6 Uhr bis etwa 12 Uhr durchgeführt. Später entnommene Blutproben wurden nicht zytometrisch ausgewertet, um tageszeitabhängige Effekte zu vermeiden. Es handelte sich hierbei um peripheres Blut, welches mit dem Chelatbildner EDTA versetzt wurde, um die Blutgerinnung zu inhibieren. Ein Entnahmeröhrchen enthielt 9 ml, wobei davon 1 ml für die Cytomics Analyse abgenommen wurde. Für die zytometrische Messung aufbereitet wurden die Proben innerhalb eines Zeitfensters von 2 bis 4 Stunden.

Alle Probanden haben im Rahmen der LIFE-Studie eine schriftliche Einverständniserklärung zur Gewinnung und Untersuchung ihrer Blutproben und anderer Biomaterialien unterschrieben [42].

3.2.2 Probenaufarbeitung

Die Aufbereitung der Blutproben wurde durch Dritte vorgenommen. Die einzelnen Schritte und die Protokolloptimierung können in [43] nachgelesen werden und sind daher nachfolgend nur im Kurzen erläutert.

Als erstes wurden in einem 50 ml Plastik Falkontube die Erythrozyten lysiert, um die spätere Analyse der Leukozyten zu optimieren, da Erythrozyten unspezifisch Antikörper binden und somit die spezifische Färbung von Leukozyten stören, indem sie die Signale der Lichtstreuung und damit der zytometrisch erfassten Daten beeinflussen. Hierfür wurden zu 1 ml EDTA-Blutprobe 25 ml Lysepuffer gegeben. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die Probe 5 min bei 340 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde zwei Mal mit 15 ml PBS Puffer unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte eine Resuspension in 300 µl 0,5 % BSA in PBS. Besonders bei der Untersuchung von Granulozyten ist die Zugabe von BSA erforderlich, da dieses die unspezifische Antikörperbindung und damit die Verklumpung von Granulozyten reduziert [27]. Anschließend wurden 100 µl der Leukozytensuspension in einem 5 ml FACS Röhrchen mit 27 µl eines fluoreszenzmarkierten Antikörper-Cocktails versetzt. Hierfür wurde ein besonderes Protokoll, das OMIP-023 (engl. *Optimized Multicolor Immunofluorescence Panel*) eingesetzt, welches speziell für die LIFE-Studie entwickelt wurde. Dieses besteht aus 13 verschiedenen Antikörpern, welche in Tabelle 1 mit ihren Zielstrukturen [27, S. 58–60; 44] dargestellt sind. Die optimalen Konzentrationen der Antikörper wurden mittels Titration bestimmt. Der Antikörper-Cocktail wurde maximal 48 Stunden in Dunkelheit bei 4–8 °C gelagert. Die gefärbte Probe wurde bei Raumtemperatur und in Dunkelheit 120 Minuten inkubiert. Diese in Testreihen bestimmte Inkubationszeit benötigt eine geringere Antikörperkonzentration für optimale Fluoreszenzintensitäten zu vergleichsweise kürzeren Inkubationszeiten. Anschließend folgten zwei weitere Waschschrte mit 2 ml PBS, 5-minütiger Zentrifugation bei 340 g und Abgießen des Überstandes um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und somit störende Hintergrundsignale zu eliminieren. Abschließend wurden die Zellen in 300 µl Fixierungspuffer (Paraformaldehyd-PBS-Lösung) resuspendiert und analysiert oder bei 4 °C für maximal 24 Stunden gelagert.

Tabelle 1: Zusammenfassung des OMIP-023-Antikörper-Cocktails, welcher zum Anfärben der Proben verwendet wurde [43]. (APC) Allophycocyanin (Ax) Alexa (Cy) Cyanin (ECD) Energiegekoppelter Farbstoff (engl. *energy-coupled dye*) (FITC) Fluoreszeinisothiocyanat (H7) Highlight 750 (PB) Pazifikblau (PE) Phycoerythrin (V500) Horizon 500.

Spezifität	Fluoreszenzfarbstoff	Antikörper Klon	Hersteller und Artikelnr.	Volumen (µl pro Färbung)	Zielstruktur
CD45	PB	J.33	BC A74743	2	Alle Leukozyten
CD3	V500	SP34-2	BC B00068	3	T-Zellen (T-Zell-Rezeptor)
CD4	APC-H7	SK3	BD 641398	2	T-Helfer-Zellen, Monozyten (MHC-II-Ag Korezeptor)
CD8	FITC	B9.11	BC A07756	2	Zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen (MHC-I-Ag Korezeptor)
CD14	FITC	RMO52	BC IM0645U	2	Monozyten, Granulozyten (LPS-Korezeptor)
CD16	PE-Cy7	3G8	BC 6607118	2 (1:10 verdünnt mit PBS + BSA)	Monozyten, NK-Zellen, Neutrophile (Fcγ Rezeptor IIIa)
CD56	PE-Cy7	N901 (NKH-1)	BC A21692	2	NK-Zellen, NKT-Zellen (NCAM neural cell adhesion molecule)
CD19	FITC	J3-119	BC A07768	2	B-Zellen
CD38	PE-Cy5.5	LSI198.4.3	BC A70205	2	Aktivierte T- und B-Zellen (Plasmazellen), Monozyten (cyclic ADP ribose hydrolase)
CD25	ECD	B1.49.9	BC 6607112	2	Aktivierungsmarker (IL2-Rezeptor α) Lymphozyten, Monozyten
CD69	PE	TPI.55.3	BC IM1943U	2	Aktivierungsmarker (T- und B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, neutrophile Granulozyten)
CD127	APC-Ax700	R 34.34	BC A71116	2	Regulatorische T-Zellen (IL7-Rezeptor α)
HLA-DR	APC	Immu-357	BC IM3635	2	B-Zellen, Monozyten (HLA-Klasse-II-Rezeptor)

3.2.3 Durchflusszytometrie

Die zytometrische Analyse der Daten erfolgte mit dem Zytometer Navios der Firma Beckman Coulter, welches mit einem blauen, roten und violetten DPSS-Laser (Dioden gepumpter Festkörperlaser, engl. *diode pumped solid state*) ausgestattet ist. Eine besonders hohe Sensitivität wird bei diesem Gerät durch eine Trennung des Seitwärtsstreu-lichts von der Fluoreszenzachse erreicht. Weiterhin können durch die Kombinationen verschiedener Vorwärtsstreulicht-Winkel selbst extrem kleine Partikel (0,4 und 0,5 μm) voneinander mittels hochauflösender Scatter unterschieden werden.

Eingebaut im Navios ist ein lichtgeschütztes Proben-Karussell, welches bis zu 32 Proben vollautomatisch abarbeiten kann. Vor der Messung wird dabei jedes Messröhrchen einzeln mittels eingebautem Vortex aufgemischt, um sedimentierte Partikel in Suspension zu bringen, was Messfehler verringert und durch die Automatisierung eine hohe Zeitersparnis darstellt.

Mit Hilfe der drei Laser können verschiedene Fluoreszenzfarben angeregt und mittels der 10 Detektoren unterschieden werden. Um den Spektralbereich der verschiedenen Fluoreszenzkanäle sicherzustellen, wird das emittierte Licht durch zwei verschiedene Filter gelenkt. Detektiert wird also nur das Licht, welches folgende Eigenschaften aufweist: eine geringere Wellenlänge als der eingelegte dichroitische Filter, eine höhere Wellenlänge als der vorherige dichroitische Filter und eine Wellenlänge innerhalb der Spannweite des Bandpassfilters (siehe Abbildung 2 in Abschnitt 1.2.1). Somit ist eine Analyse von 13 verschiedenen Oberflächenmarkern in 10 Fluoreszenzkanälen möglich (siehe Tabelle 2).

Die Kompensationsmatrix wurde automatisch durch Wizard Tools der Navios Software unter Zuhilfenahme von Messungen mit Einzelfärbungen (mit nur einem Antikörper) erstellt [43].

3.2.4 Analyse mittels FlowJo

Die Analyse der durchflusszytometrisch gemessenen Daten wurde mittels FlowJo V.10.0.7 Tree Star durchgeführt. Hierbei wurde ein manuelles Gating angewandt, welches auf der Grundlage von OMIP-023 [43] beruht. Die individuellen Gatingfähigkeiten wurden in einem arbeitsgruppeninternen Test überprüft.

Eine Erhöhung der Anzahl an Merkmalen einer Zelle, welche während einer Messung erfasst werden können, wurde durch das Kombinieren verschiedener Antikörper auf einen Fluoreszenzfarbstoff erreicht. In diesem Fall wurden die Antikörper für CD8, CD14 und CD19 an den Farbstoff FITC gekoppelt, da diese Antigene normalerweise nicht auf der gleichen Zelle vorkommen. CD14 ist ein Marker für Monozyten (und in sehr geringem Maße für Neutrophile), welche mit Hilfe des Seitwärtsstreulicht (SSC) zu Vorwärtsstreulicht (FSC) Verhältnisses gut von Lymphozyten abgegrenzt werden können. CD19 kommt bei B-Zellen vor, CD8 bei T- und NK-Zellen, welche untereinander über CD3 sowie CD16/56 differenziert werden können. Die Antigene für CD16 und CD56 kommen als Oberflächenproteine bei NK-Zellen in Kombination vor, die Abgrenzung zu CD16⁺ Monozyten bzw. Neutrophilen ist über eine Bestimmung von CD38 und CD14 bzw. FSC und SSC möglich. Daher erlaubt sich eine Kombination auf einen Farbstoff (Pe-Cy5). Somit ist eine klare Zuordnung von CD-Molekülen bei Fluoreszenz des mehrfach belegten Farbstoffs gegeben und man erhält insgesamt eine Analyse für 13 verschiedene Oberflächenmarker in 10 Fluoreszenzkanälen (siehe Tabelle 2).

Bevor die eigentlichen Populationen von Interesse analysiert werden, müssen in jeder Blutprobe Artefakte und Störgrößen ausgeschlossen werden. Für den Ausschluss von Luftblasen, die beim Ansaugen der letzten Probenreste entstehen können, sobald die Probe vollständig aufgetragen wird, wird SS-H gegen die Zeit abgetragen. Um mögliche Doubletten (dies sind Ereignisse bei denen zwei Zellen statt einer durch den Probenstrom laufen) aus den zu analysierenden Gesamtereignissen zu entfernen, wird nach dem Protokoll ab 2013 FS-A gegen FS-W (Abbildung 6) bzw. nach dem initialen Protokoll (Proben im Zeitraum von 2011 bis 2012) SS-A gegen SS-H (Abbildung 7) aufgetragen. Dieser Schritt ist speziell bei der Betrachtung von Granulozyten wichtig, da besonders aktivierte Granulozyten bekannter Weise zur Aggregation untereinander neigen [34, S. 240].

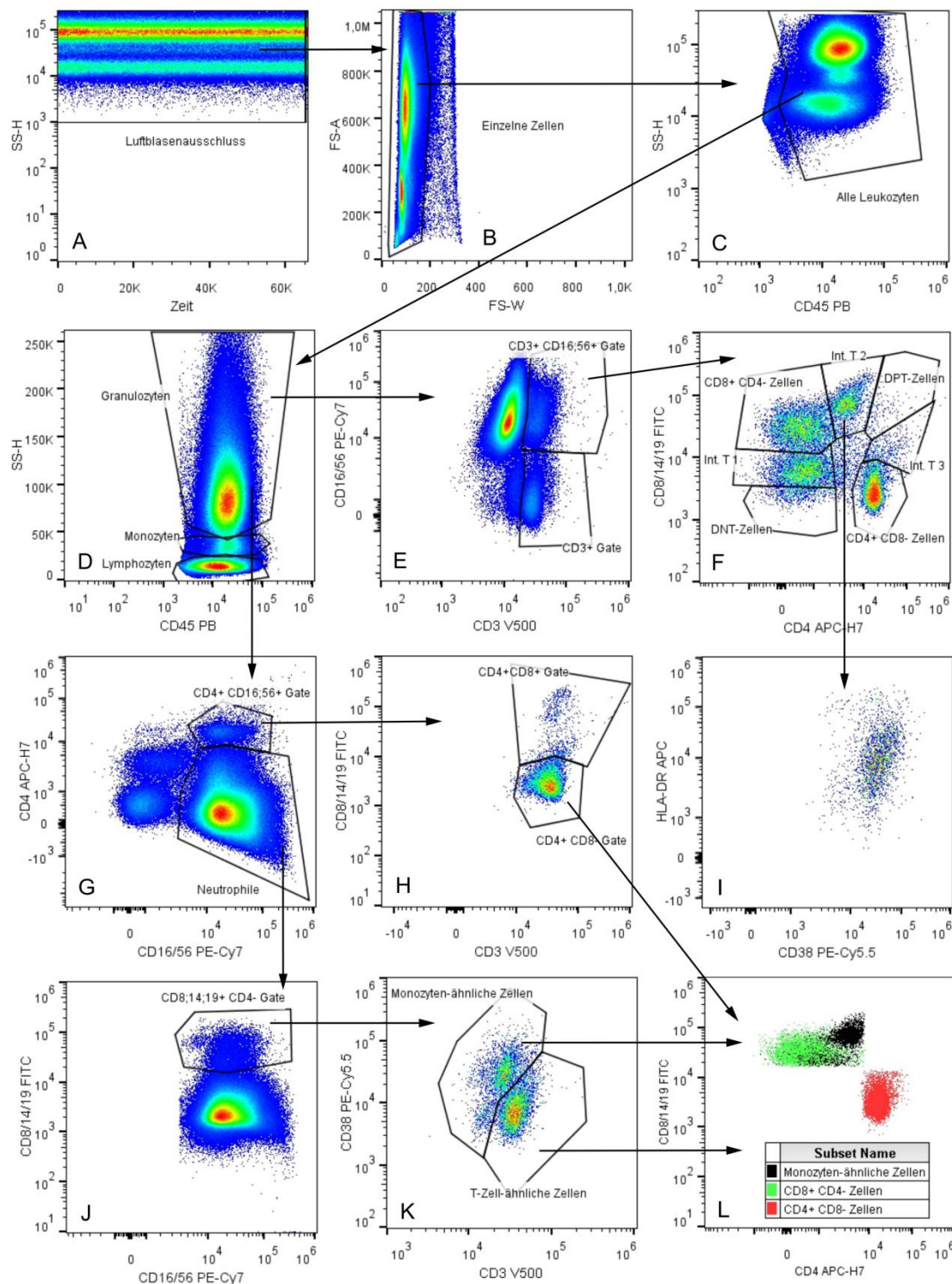


Abbildung 6: Gatingschema für Granulozyten-Subpopulationen ab 2013. (A) Luftblasenausschluss (B) Doubletenuausschluss (C) Ausschluss CD45⁻ Ereignisse (D) Differenzierung von Lymphozyten mit basophilen Granulozyten, Monozyten und Neutrophilen mit eosinophilen Granulozyten (E) Gating von CD3⁺ CD16/56⁺ Ereignissen, LL1 (F) erweitertes T-Zell-Gating, Erstellung siehe Abbildung 8 (I) Gating der Int. T2 Ereignisse auf CD38 und HLA-DR als Hinweis auf monozytäre Verunreinigung (G) Differenzierung der CD16/56⁺ Ereignisse bezüglich CD4 (H) Untersuchung der CD16/56⁺ CD4⁺ auf CD8 (J) Gating von CD8/14/19⁺ Ereignissen unter den CD16/56⁺ CD4⁺ (K) mit weiterer Differenzierung in ML und LL2 (L) Backgating von ML, LL2 und LL3 zur Lagedarstellung der Ereignisse verglichen mit (F).

Das weitere Gating ist speziell für diese Arbeit auf einzelne Zellpopulationen beschränkt und beginnt mit einem Ausschluss von CD45⁻ Ereignissen (CD45 gegen SS-H), wozu Erythrozyten, Zelltrümmer und Thrombozyten zählen (Abbildung 6 A-C, Abbildung 7 A-C). Dieser Ausschluss erfolgt über die Intensitätsmessung des Fluoreszenzfarbstoffs PB, welcher an den Antikörper gegen CD45 gekoppelt wurde (siehe Tabelle 1). Ereignisse mit einer geringeren Intensität hierfür werden dann als CD45 negativ identifiziert, da diese das Oberflächenmolekül nicht exprimieren und damit den fluoreszenzgekoppelten Antikörper nicht binden. Die erhaltene Zahl an CD45⁺ Events enthielt alle Leukozytenereignisse, mit dessen Hilfe die Prozentsätze der Leukozytensubpopulationen berechnet werden konnten (relative Zellzahlen). Absolute Zellzahlen in 10⁹/l wurden aus diesen Prozentsätzen und dem WBC, welcher automatisch mit Hilfe des Hämatologie Analysators XN-9000 (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland) gemessen wird, berechnet:

$$\text{Absolute Zellzahl} \left[\frac{10^9}{l} \right] = \text{WBC} \left[\frac{10^9}{l} \right] \cdot \frac{\text{Anzahl Ereignisse in Zellsubpopulation}}{\text{Alle Leukozytenereignisse}}$$

In vorherigen, unveröffentlichten Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Attila Tárnok wurden im Granulozyten-Scattergate ungewöhnliche Granulozyten entdeckt, die teils einen Lymphozyten- bzw. Monozyten-ähnlichen Charakter aufweisen. Um diese bislang noch nicht näher untersuchten untypischen Zellen erstmals detailliert zu betrachten, wurde für diese Arbeit eine Gating-Strategie entwickelt, welche im Folgenden erläutert wird.

Nach Gating des Granulozytenscatters (SS-H gegen CD45) wurden die CD45⁺, SS-H^{mid-high} Ereignisse als erstes auf CD3⁺ Ereignisse untersucht (Abbildung 6 E, Abbildung 7 E). Da dies ein Oberflächenmarker für T-Lymphozyten ist, wurde an der gefundenen CD3⁺ CD16/56⁺ Population ein erweitertes T-Zell-Gating angewandt (Abbildung 6 F, Abbildung 7 F). Um dieses Gating trotz geringer Ereignishäufigkeiten möglichst standardisiert durchzuführen, wurden die Gates zuvor im Lymphozytenscatter an T-Lymphozyten erstellt (Abbildung 8) und im Nachhinein auf die CD3⁺ Ereignisse im Granulozytenscatter angepasst.

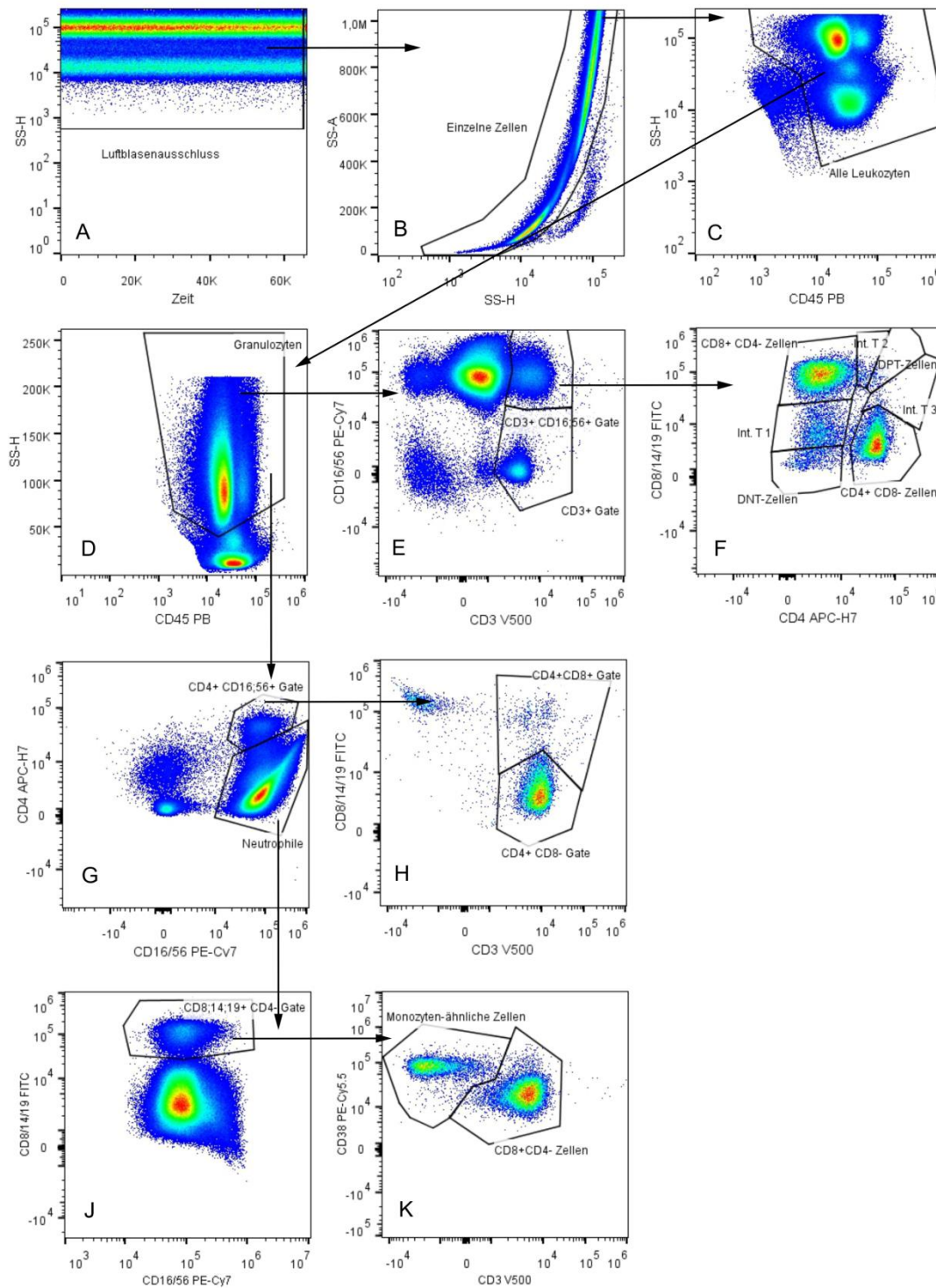


Abbildung 7: Gatingschema für Granulozyten Subpopulationen mit abgeänderter TOF. (A) Luftblasenausschluss (B) Doublettenausschluss (C) Ausschluss CD45⁻ Ereignisse (D) Differenzierung von Lymphozyten mit basophilen Granulozyten, Monozyten und Neutrophilen mit eosinophilen Granulozyten (E) Gating von CD3⁺ CD16/56⁺ Ereignissen, LL1 (F) erweitertes T-Zell-Gating, Erstellung siehe Abbildung 8 (G) Differenzierung der CD16/56⁺ Ereignisse bezüglich CD4 (H) Untersuchung der CD16/56⁺ CD4⁺ auf CD8 (J) Gating von CD8/14/19⁺ Ereignissen unter den CD16/56⁺ CD4⁻ (K) mit weiterer Differenzierung in ML und LL2.

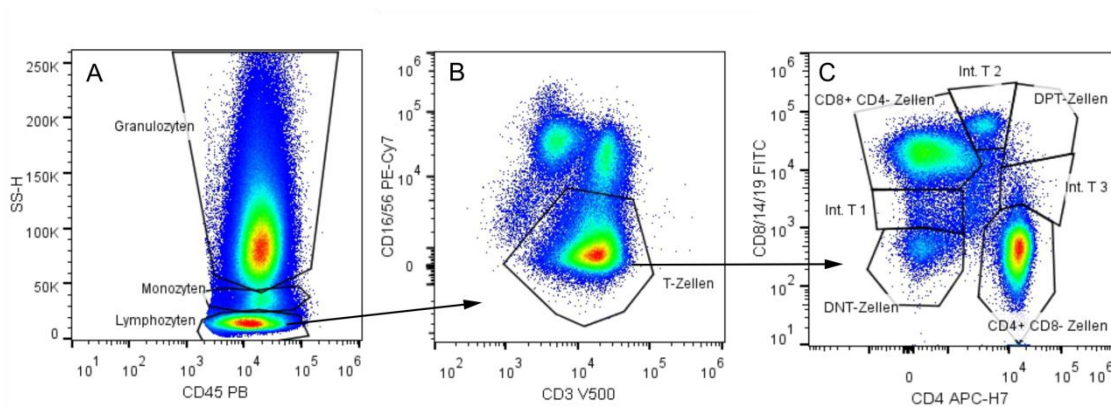


Abbildung 8: Gatingschema von Lymphozyten als Vorlage für das Gating der $CD3^+$ Ereignisse im Granulozytenscatter. (A) Differenzierung von Lymphozyten mit basophilen Granulozyten, Monozyten und Neutrophilen mit eosinophilen Granulozyten (B) Lymphozytengating auf $CD3^+$ $CD16/56^-$ Ereignisse (T-Zellen) (C) differenziertes T-Zellgating zur Identifikation von Subpopulationen (DNT-Zellen: doppelt negative T-Zellen, Int T 1-3: Intermediäre T-Zellen 1-3, DPT-Zellen: doppelt positive T-Zellen), insbesondere von $CD8^+$ $CD4^-$ und $CD4^+$ $CD8^-$.

Wie in Abbildung 6 F und Abbildung 7 F zu sehen ist, gibt es unter den $CD3^+$ $CD16/56^+$ Ereignissen zwei Hauptpopulationen, die $CD8^+$ $CD4^-$ und die $CD4^+$ $CD8^-$. Um diese Populationen genauer zu betrachten und deren Verunreinigung durch Neutrophile zu vermindern, wurde ein alternatives Gatingschema angewandt. Hierbei wurden die für Granulozyten typischen $CD16/56^+$ Ereignisse untersucht (Abbildung 6 G, Abbildung 7 G). Dabei wurden im $CD4^+$ $CD16/56^+$ Gate die $CD8^-$ Ereignisse erfasst (Abbildung 6 H, Abbildung 7 H), welcher der gesuchten $CD4^+$ $CD8^-$ Population im Granulozytenscatter entspricht (Abbildung 6 L).

Um die Verunreinigung der $CD3^+$ $CD16/56^+$ Ereignisse zu vermindern, wurden Monozyten-ähnliche Zellen (Abbildung 6 F, Abbildung 7 F: bezeichnet als Int. T 2 (Intermediäre Zellen 2)) von den ursprünglichen Ereignishäufigkeiten abgezogen. Differenziert wurden diese anhand der hohen Fluoreszenz der Marker HLA-DR und CD38 (Abbildung 6 I) [44].

Die übrigen Populationen der $CD3^+$, $CD16/56^+$ Ereignisse wurden aufgrund geringer Ereignishäufigkeiten (meist unter 100 Gesamtereignisse pro Population) nicht näher betrachtet, da dies unter anderem ein Ausschlusskriterium darstellt (siehe Abschnitt 3.2.6). Die Definition des Kriteriums erfolgte aufgrund der erhöhten Fehleranfälligkeit der statistischen Analysen bei der Berechnung von Populationen mit geringen Ereignishäufigkeiten. Um die Datenreinheit zu gewährleisten wurden daher Ereignishäufigkeiten als Ausschlusskriterien festgesetzt.

Unter der Hauptpopulation des Granulozytenscatters ($CD16/56^+$ $CD4^-$), welche typischerweise neutrophile Granulozyten darstellen, wurden im $CD8/14/19^+$ Gate Monozyten-ähnliche Zellen ($CD16^+$ $CD14^+$ $CD38^+$) und Lymphozyten-ähnliche Zellen

(CD16/56⁺ CD8⁺ CD3⁺) gefunden (Abbildung 6 K, Abbildung 7 K), wobei die Lymphozyten-ähnlichen Zellen der CD8⁺ CD4⁻ Population entspricht (Abbildung 6 L). Diese Subpopulationen sind in der Literatur bisher nicht zu finden und werden daher hier näher untersucht, wobei diese Arbeit auf die phänotypische Beschreibung der Zellen und auf die Analyse von möglichen Korrelationen zu ausgewählten Parametern abzielt. Untersuchungen zur Funktion der Subpopulationen sind nicht vorgesehen. Um die heterogene Verteilung der relevanten Subpopulationen im Granulozytenscatter zu zeigen, welche eine ausschließliche Verunreinigung der Granulozyten mit anderen Zellen sehr unwahrscheinlich macht, ist in Abbildung 9 das Backgating dieser Ereignisse dargestellt.

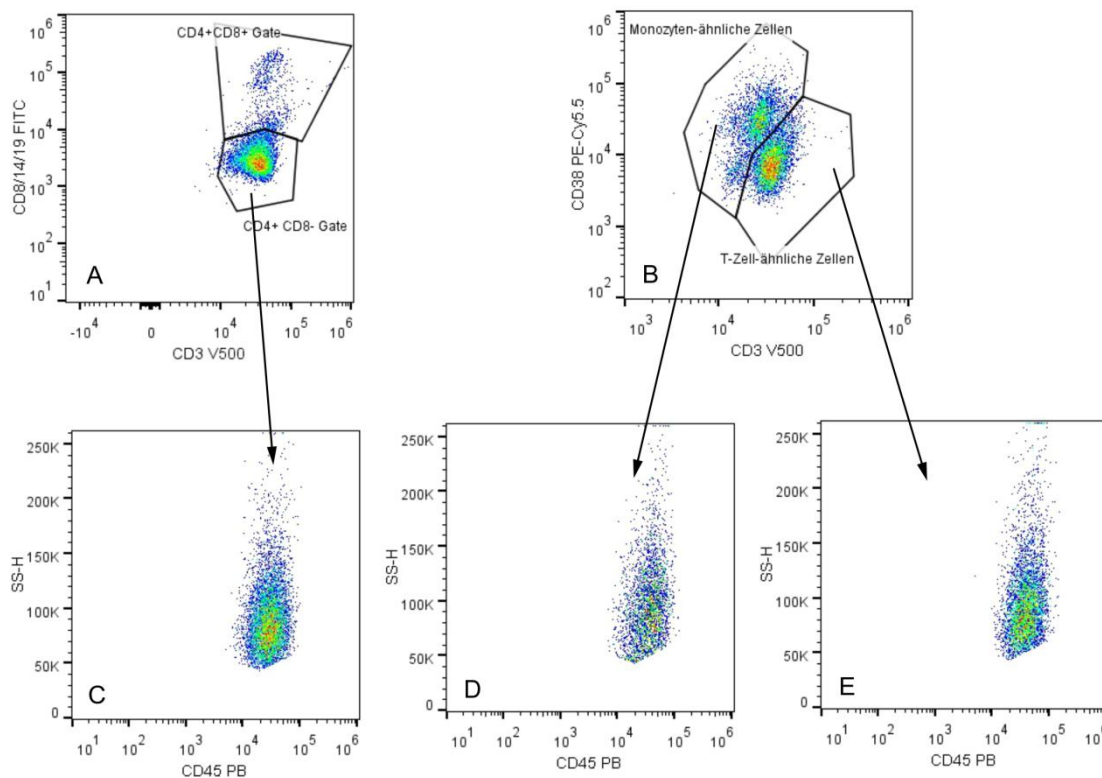


Abbildung 9: Backgating der relevanten Subpopulationen LL3 (A und C), ML (B und D) und LL2 (B und E) auf CD45⁺ SS-H^{mid-high} zur Darstellung der Verteilung der Populationen im Granulozytengate.

Die CD3⁺ CD16/56⁻ Ereignisse (Abbildung 6 E, Abbildung 7 E) wurden als Eosinophile identifiziert. Diese zeigen für eine Vielzahl an Parametern eine hohe Autofluoreszenz, unter anderem kann auch die hohe Intensität der Fluoreszenz für CD3 als solche angenommen werden.

Die einzelnen Zelltypen mit deren Phänotypen sind in Tabelle 3 dargestellt. Die statistische Auswertung im Ergebnisteil dieser Arbeit bezieht sich dabei auf die hervorgehobe-

nen Zellpopulationen und nicht auf die Zwischenstufen des Gatingprozesses. Der Grund hierfür liegt unter anderem in den gezielt herausgesuchten Subpopulationen mit möglicher kardiovaskulärer Relevanz sowie in dem schon genannten Ausschluss von Populationen mit besonders geringen Ereignishäufigkeiten.

Tabelle 3: Granulozyten-Subtypen mit Phänotypisierung.

Zelltyp	Plot	Phänotypen
Leukozyten	SS-H:CD45	CD45 ⁺ , SS-H ^{low bis high}
Granulozyten	SS-H:CD45	CD45 ⁺ , SS-H ^{mid-high}
LL1 (CD3⁺ CD16/56⁺)	CD16/56:CD3	CD3 ⁺ , CD16/56 ⁺ , CD45 ⁺ , SS-H ^{mid-high}
Eosinophile Granulozyten	CD16/56:CD3	CD3 ⁺ , CD16/56 ⁺ , CD45 ⁺ , SS-H ^{mid-high}
CD4 ⁺	CD4:CD16/56	CD4 ⁺ , CD16/56 ⁺ , CD45 ⁺ , SS-H ^{mid-high}
CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD8/14/19:CD3	CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD3 ⁺ , CD16/56 ⁺ , CD45 ⁺ , SS-H ^{mid-high}
LL3 (CD4⁺ CD8⁻)	CD8/14/19:CD3	CD4 ⁺ , CD8 ⁻ , CD3 ⁺ , CD16/56 ⁺ , CD45 ⁺ , SS-H ^{mid-high}
Neutrophile Granulozyten	CD4:CD16/56	CD4 ⁺ , CD16/56 ⁺ , CD45 ⁺ , SS-H ^{mid-high}
ML	CD38:CD3	CD38 ⁺ , CD3 ⁺ , CD14 ⁺ , CD4 ⁺ , CD16 ⁺ , CD45 ⁺ , SS-H ^{mid-high}
LL2 (CD8⁺ CD4⁻)	CD38:CD3	CD3 ⁺ , CD38 ^{low} , CD8 ⁺ , CD4 ⁻ , CD16/56 ⁺ , CD45 ⁺ , SS-H ^{mid-high}

3.2.5 Merkmalsanalyse

Die Merkmale bezüglich des Geschlechts, des Alters, des Rauchstatus und des Alkoholkonsums wurden anamnestisch erhoben. Dabei wurden unter dem Rauchstatus die Merkmalsausprägungen Nichtraucher, gegenwärtiger Raucher und ehemaliger Raucher zur Auswahl gestellt. Probanden, welche in ihrem Leben über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten regelmäßig (1 Zigarette pro Tag oder mindestens 5 Zigaretten pro Woche oder mindestens 1 Packung Zigaretten pro Monat oder 1 Zigarillo pro Tag oder mindestens 5 pro Woche oder 2 Zigarren pro Woche oder 2 Pfeifen pro Woche) geraucht haben, wurden dazu angehalten, sich als Raucher zu bezeichnen. Zum Status ehemaliger Raucher wurden keine zeitlichen Einschränkungen angegeben, wie lange eine Abstinenz andauern sollte. Für einige statistische Analysen wurde eine Kategorie „aktuelle Nichtraucher“ gebildet, welche die Probanden mit den Merkmalsausprägungen Nichtraucher und ehemalige Raucher beinhaltet. Der Alkoholkonsum wurde anhand der Alkoholaufnahme in Gramm pro Tag erfragt und nach WHO für beide Geschlechter in vier Kategorien unterteilt (siehe Tabelle 4). Aufgrund der niedrigen Anzahl an Probanden, welche der letzten Kategorie (hochgefährlicher Konsum) zugeteilt werden konnten (0,4 % der in diesem Merkmal erfassten Probanden) und damit einer deutlichen Ungleichverteilung

innerhalb der Merkmalsausprägungen, wurden die letzten beiden Kategorien für die Analysen in dieser Arbeit aggregiert.

Tabelle 4: Kategorien der täglichen Alkoholaufnahme (in Gramm) nach Geschlecht laut WHO (links) und für die eigene statistische Betrachtung (rechts) mit Fallzahlen (n).

Kategorien nach WHO	Frauen		Männer		Kategorien für die statistische Analyse
	Alkoholaufnahme pro Tag	n	Alkoholaufnahme pro Tag	n	
Risikoarmer Konsum	20 g	365	30 g	233	Risikoarmer Konsum
Riskanter Konsum	> 20 g	21	> 40 g	66	Riskanter Konsum
Gefährlicher Konsum	> 40 g	6	> 60 g	24	Gefährlicher bzw. hochgefährlicher Konsum
Hochgefährlicher Konsum	> 80 g	1	> 120 g	2	

Die stetigen Variablen HDL [mmol/l], LDL [mmol/l] sowie WHR wurden anhand laborchemischer bzw. klinischer Untersuchungen erfasst. Der Taillenumfang wurde dabei mittig zwischen unterem Rand der letzten tastbaren Rippe und oberem Ende der Crista iliaca am Ende der Expiration gemessen, der Hüftumfang an der breitesten Stelle des Gesäßes [45].

Zur Untersuchung der arteriellen Hypertonie wurden in dieser Arbeit drei Kategorien bezüglich der Bekanntheit des arteriellen Hypertonus festgelegt (siehe Tabelle 5). Bei der Messung des Blutdruckes wurde ein Mittelwert aus drei aufeinanderfolgenden Messungen gebildet, wobei die erste Messung nach fünf Minuten Ruhephase, die zweite und dritte Messung nach jeweils drei weiteren Minuten in Ruhe erhoben wurde. Ein hypertoner Messwert wurde nach Richtlinien der Deutschen Hochdruckliga e.V. bei Werten größer als 140/90 mmHg festgelegt. Bestand bei den Probanden anamnestisch kein Bluthochdruck, erfolgte eine Zuteilung in die Gruppe „Kein Bluthochdruck“ bei erhobenem Messwert kleiner gleich 140/90 mmHg, eine Zuteilung in die Kategorie „Hypertoner Messwert ohne vorherige Bluthochdruckdiagnose“ erfolgte wiederum bei Werten größer als 140/90 mmHg. Bei anamnestisch bekanntem Hypertonus erfolgte direkt eine Zuteilung in diese Kategorie, unabhängig der erhobenen Messwerte. Diese Gruppe fasst folglich gut und schlecht eingestellte Hypertoniker unabhängig ihrer Medikation zusammen.

Tabelle 5: Kategorien des Merkmals arterielle Hypertonie.

Kategorie	Beschreibung
Kein Bluthochdruck	Anamnestisch kein Bluthochdruck bekannt und zur körperlichen Untersuchung ein Messwert $\leq 140/90$ mmHg
Bekannter Bluthochdruck	Anamnestisch bekannter Bluthochdruck unabhängig vom gemessenen Ergebnis
Hypertoner Messwert ohne vorherige Bluthochdruckdiagnose	Anamnestisch kein Bluthochdruck bekannt, aber zur körperlichen Untersuchung ein Messwert $> 140/90$ mmHg

3.2.6 Probandenausschluss

Von den 963 zytometrisch erfassten Datensätzen konnten nicht alle in der statistischen Auswertung berücksichtigt werden. Proben, bei denen während der Präparation ein methodischer Fehler auftrat (zum Beispiel einer der 13 Antikörper vergessen oder unzureichend pipettiert wurde oder ein hoher Zellverlust in einem der Waschschritte auftrat) wurden von der Analyse ausgeschlossen.

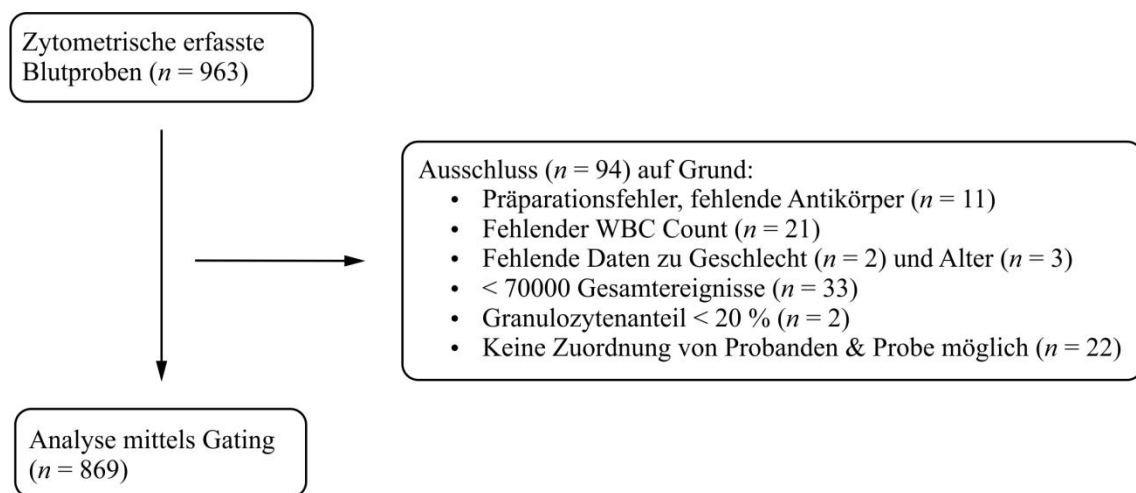
Eingeschlossen in die Auswertung dieser Arbeit wurden Blutproben nur, wenn mehr als 70.000 Ereignisse in einer Probe mittels Zytometrie gemessen wurden und die relative Granulozytenzahl (in Bezug auf alle Leukozyten) über 20 % betrug. Wenn in einer der vier relevanten Leukozytenpopulationen weniger als 100 Ereignisse erfasst wurden, wurde für diese Probe die jeweilige Subpopulation für die statistische Analyse ausgeschlossen. Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird bei der jeweiligen Zellpopulation auf ausgeschlossene Probanden hingewiesen.

Auch Probanden, denen nicht eindeutig eine Blutprobe zugeordnet werden konnte, wurden ausselektiert. Hierzu zählen mehrere Blutproben pro Proband bei ungenauen Entnahmedaten sowie Fehler bei der Zuordnung von Probennummern zum jeweiligen Probanden. Ein weiteres Ausschlusskriterium war die Diagnose einer chronischen Krankheit wie zum Beispiel eine chronisch lymphatische Leukämie [46]. Eigenanamnestisch erhobene einmalige Ereignisse, wie ein stattgehabter Apoplex oder Myokardinfarkt wurden hierunter nicht gezählt und damit auch nicht ausgeschlossen.

Ein anderes wichtiges Merkmal war der WBC Count (Leukozytengesamtzahl). Fehlte dieser Wert für einen Probanden, wurde dieser auch ausgeschlossen. Die Ein- und Ausschlusskriterien der schlussendlich zur statistischen Auswertung herangezogenen Daten sind in Tabelle 6 und Abbildung 10 zusammengefasst.

Tabelle 6: Ein- und Ausschlusskriterien der Probanden/Proben.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Probanden der LIFE-Adult Kohorte • Alter: 18-79 Jahre • Blutentnahmezeitpunkt: 6-12 Uhr • ≥ 70.000 Ereignisse gemessen • Granulozyten/Leukozyten $\geq 20\%$ 	<ul style="list-style-type: none"> • Bestehende Schwangerschaft (allgemein für LIFE) • Bestehende chronische Erkrankung • Keine eindeutige Zuordnung von Blutprobe und Proband • Fehlender WBC Count • Methodischer Fehler bei der Probenpräparation • < 100 Ereignisse der zu analysierenden Leukozytenpopulation

**Abbildung 10:** Flussdiagramm zur Darstellung der Ausschlusskriterien mit jeweiliger Anzahl an ausgeschlossenen Blutproben. (WBC Count) Leukozytengesamtzahl, engl. *white blood cell count* (n) Fallzahlen.

Unter den genannten Bedingungen wurden letztlich für die zytometrische Analyse in dieser Arbeit Blutproben von 869 Probanden der LIFE-Adult Kohorte eingeschlossen (siehe Abbildung 10), davon 53,5 % Frauen und 46,5 % Männer. Die Alters- und Geschlechtsverteilung der Probanden ist in Tabelle 7 und grafisch in Abbildung 11 dargestellt und stellt eine repräsentative Stichprobe der LIFE-Adult-Studie dar (siehe Abbildung 5 in 1.3). Da eine so feine Unterteilung der Altersgruppen keine Unterschiede für einen Großteil verschiedener Leukozytensubpopulationen in Voranalysen zeigte [46], wurden die Probanden für die Altersanalyse dieser Arbeit nicht in Altersgruppen aufgeteilt.

Tabelle 7: Kreuztabelle bezüglich Alters- und Geschlechtsverteilung der eingeschlossenen Probanden.

		Geschlecht		Gesamt
		männlich	weiblich	
Altersgruppe	18-24	7	7	14
	25-29	6	11	17
	30-34	20	10	30
	35-39	14	21	35
	40-44	49	52	101
	45-49	43	56	99
	50-54	46	48	94
	55-59	39	45	84
	60-64	42	59	101
	65-69	53	70	123
	70-74	57	56	113
	75-79	28	30	58
Gesamt	18-79	404	465	869

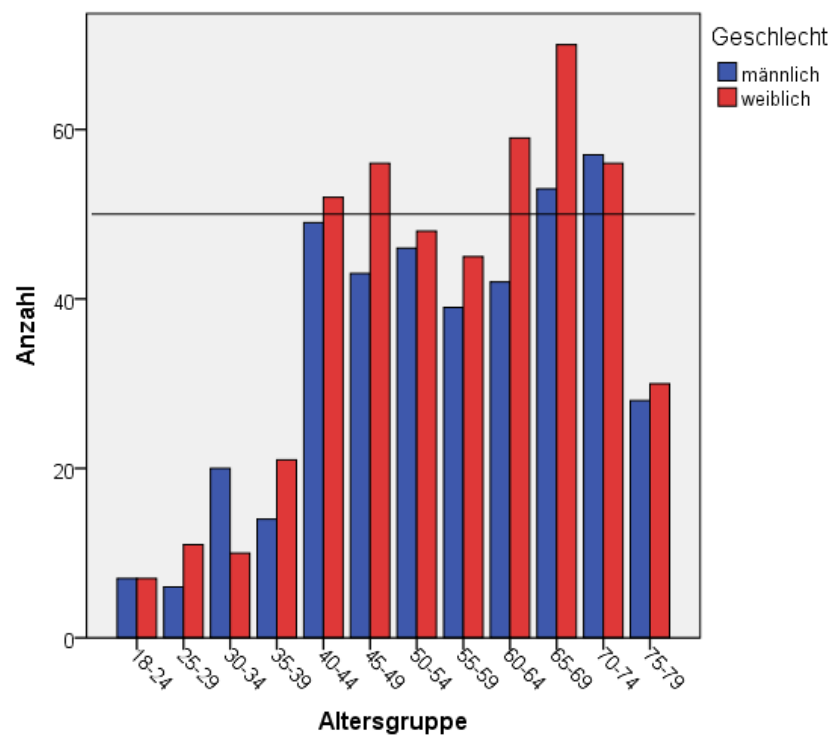


Abbildung 11: Darstellung der Altersverteilung der Probanden geschlechtsspezifisch unterteilt (Markierung zur Darstellung der angestrebten Probandenanzahl).

3.3 Statistische Methoden

Sämtliche Auswertungen der Gatingergebnisse wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2010 mittels Erstellung von Tabellen der Einzelergebnisse durchgeführt. Diese konnten dann für weitere Berechnungen, wie der relativen und absoluten Zellzahl verwendet werden (Formel siehe Abschnitt 3.2.4).

Die statistische Auswertung sowie die Erstellung sämtlicher Diagramme erfolgten mittels der Programme Microsoft Excel 2010 und IBM SPSS Statistics 21.

Um die Verwendung adäquater statistischer Auswertungsverfahren zu gewährleisten, wurden die Daten als erstes auf Normalverteilung geprüft. Schon mittels grafischer Überprüfung konnte festgestellt werden, dass die Zellzahlen keiner Zellpopulation einer Normalverteilung genügen (beispielhaft dargestellt für die $CD3^+ CD16/56^+$ Zellpopulation in Abbildung 12). Auch eine einfache Transformation mittels Logarithmiersens der Daten erbrachte keine annähernd symmetrische Verteilung. Daher wurden nichtparametrische (verteilungsfreie) Tests angewandt. Für diese sind Ausreißer nicht relevant, da eine Ranganalyse erfolgt. Daher brauchten diese in der Auswertung nicht ausgeschlossen zu werden.

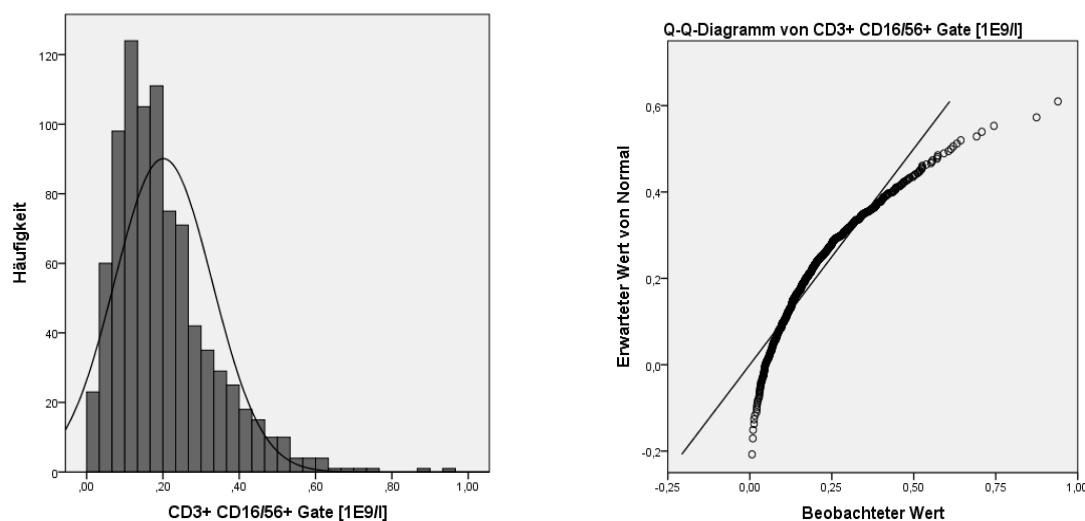


Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung der grafischen Überprüfung auf Normalverteilung der Zellhäufigkeiten mittels Histogramm und Q-Q-Diagramm für die $CD3^+ CD16/56^+$ Zellpopulation.

Für die Prüfung des Zusammenhangs zwischen Geschlecht und Zellzahlen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben verwendet [47, S. 48].

Die Merkmalsanalyse der stetigen Variablen Alter, WHR, HDL und LDL jeweils in Zusammenhang mit der Zellzahl der Subpopulationen wurde mittels Korrelation nach Pearson durchgeführt [47, S. 63–66]. Da eine t -Testung des Korrelationskoeffizienten

zur Unterschiedlichkeit von Null zur Signifikanzprüfung aufgrund nicht normalverteilter Daten nicht empfehlenswert ist, wurden stattdessen 95 % Konfidenzintervalle des Korrelationskoeffizienten betrachtet, welche mittels Bootstrapping bestimmt wurden. Mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 % liegt der wahre Korrelationskoeffizient innerhalb des errechneten Intervalls. Eine signifikante, lineare Korrelation (Signifikanzniveau 0,05) zwischen zwei untersuchten Parametern liegt dann vor, wenn die Null im 95 % Konfidenzintervall ausgeschlossen werden kann. Der Wert des Korrelationskoeffizienten gibt dabei die Stärke des Zusammenhangs an, wobei ein Wert von -1 einen vollständigen negativen und ein Wert von +1 einen vollständigen positiven linearen Zusammenhang beschreibt.

Für die Merkmale Rauchstatus, Alkoholaufnahme und arterielle Hypertonie, welche anamnestisch bzw. durch klinische Untersuchung erhoben wurden, wurden jeweils drei Merkmalsausprägungen (Untergruppen) angenommen. Um die Anzahl der Tests so gering wie möglich zu halten und damit auch die Anzahl zufällig gefundener Zusammenhänge, wurde als Globaltest der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Mit diesem konnte die Nullhypothese, dass kein Unterschied zwischen den einzelnen Untergruppen besteht, geprüft werden. Sollte die Nullhypothese aufgrund des Testergebnisses abgelehnt werden, wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests als Post-hoc-Test die einzelnen Gruppen verglichen (jeweils maximal 3 Vergleiche).

Allgemein wurden somit bei jeder Zellpopulation sieben globale statistische Tests durchgeführt: Test auf Geschlechtsabhängigkeit (Test 1), sowie jeweils getrennt für Männer und Frauen: Tests auf Zusammenhang zwischen Zellpopulation und Rauchstatus (Test 2 und 3), täglichem Alkoholkonsum (Test 4 und 5) sowie Hypertonie (Test 6 und 7). Da bei erhöhter Anzahl an Tests die Wahrscheinlichkeit von zufällig signifikanten Ergebnissen steigt, wurde das Signifikanzniveau α von 0,05 mittels konservativem Verfahren nach Bonferroni [48] mit Hilfe von folgender Rechnung korrigiert:

$$p < \frac{\alpha}{n}$$

$$p < \frac{0,05}{7} = 0,0071$$

Daraus ergibt sich ein korrigierter α -Wert von 0,0071. Es ist zu beachten, dass diese Korrektur den Fehler erster Art von 0,05 innerhalb einer Zellpopulation, aber nicht global über alle Subpopulationen/Ratios, kontrolliert. Hierfür würde die Gesamtanzahl an Tests 42 betragen (sieben Tests pro Population für insgesamt sechs Populationen), was $\alpha \approx 0,001$ ergeben würde. Ebenfalls wurde keine Anpassung des Signifikanzniveaus für die Konfidenzintervalle der Korrelationskoeffizienten durchgeführt.

4 Ergebnisse

Die reine Beschreibung der vier bisher nicht bekannten Zellpopulationen sowie die Strategie zur Erfassung dieser, welche bereits im Abschnitt 3.2.4 im Methodenteil beschrieben wurde, sollte bereits als Ergebnis betrachtet werden. Zur inhaltlichen Folgerichtigkeit bzw. zum besseren Verständnis der Arbeit wurde sich jedoch für eine andere Gliederung entschieden. Im Ergebnisteil erfolgt die statistische Analyse der jeweiligen Zellarten. Hierbei werden in explorativer Weise die Zusammenhänge zwischen den Zellzahlen und den Merkmalen Geschlecht, Alter, WHR, HDL, LDL, Rauchstatus, Alkoholaufnahme sowie Hypertonus untersucht. Signifikante Ergebnisse werden in der jeweiligen Tabelle grau unterlegt.

4.1 Geschlechtsabhängigkeit

Zur statistischen Analyse eines Geschlechtsunterschiedes bezüglich der Zellzahlen konnten je nach Zellpopulation 866 bis 869 Datensätze herangezogen werden. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests zur Testung der Nullhypothese, es besteht kein Unterschied bezüglich der Zellzahl zwischen Männern und Frauen sowie der Median als Lagemaß und die Spannweite als Streumaß der jeweiligen Zellpopulation dargestellt. Ein Unterschied bezüglich der Zellzahl zwischen Männern und Frauen konnte bei den Monozyten-ähnlichen Zellen festgestellt werden, wobei Männer eine signifikant höhere absolute Zellzahl aufweisen (siehe Abbildung 13). Eine grafische Darstellung der weiteren Zellzahlen ist in jeweiligen Boxplots in den Anlagen zu finden (Abbildung 25 – Abbildung 27).

Obwohl eine signifikante Geschlechtsabhängigkeit in nur einer Zellpopulation nachweisbar ist, werden alle weiteren Merkmale für Männer und Frauen getrennt untersucht. Dies hat den Grund, dass einige der Merkmale selbst geschlechtsabhängig sind (WHR, Rauchstatus, Alkoholaufnahme). Zur besseren Übersichtlichkeit werden daher alle Merkmale einheitlich geschlechtergetrennt statistisch ausgewertet.

Tabelle 8: Darstellung der geschlechtergetrennten Lagemaße der Zellzahlen sowie Ergebnisse im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. (\tilde{x}) Median, (R) Spannweite (p) Asymptotische Signifikanz (2-seitig) (n) Grundgesamtheit für das jeweilige Geschlecht (*) = 10^9 l^{-1} .

	männlich		weiblich		
Zellpopulation	n	$\tilde{x} ; R$	n	$\tilde{x} ; R$	p
LL1	404	(0,1668 ; 0,6786) *	465	(0,1672 ; 0,9011) *	0,952
LL2	404	(0,0734 ; 0,458) *	465	(0,0687 ; 0,2992) *	0,048
(Neutrophile/LL2)	404	44,98 ; 3376,68	465	46,3 ; 899,87	0,449
LL3	403	(0,049 ; 0,5217) *	465	(0,058 ; 0,544) *	0,389
(Neutrophile/LL3)	403	69,62 ; 1029,15	465	59,48 ; 924,53	0,084
ML	403	(0,0336 ; 0,1608) *	463	(0,0264 ; 0,2022) *	< 0,0005

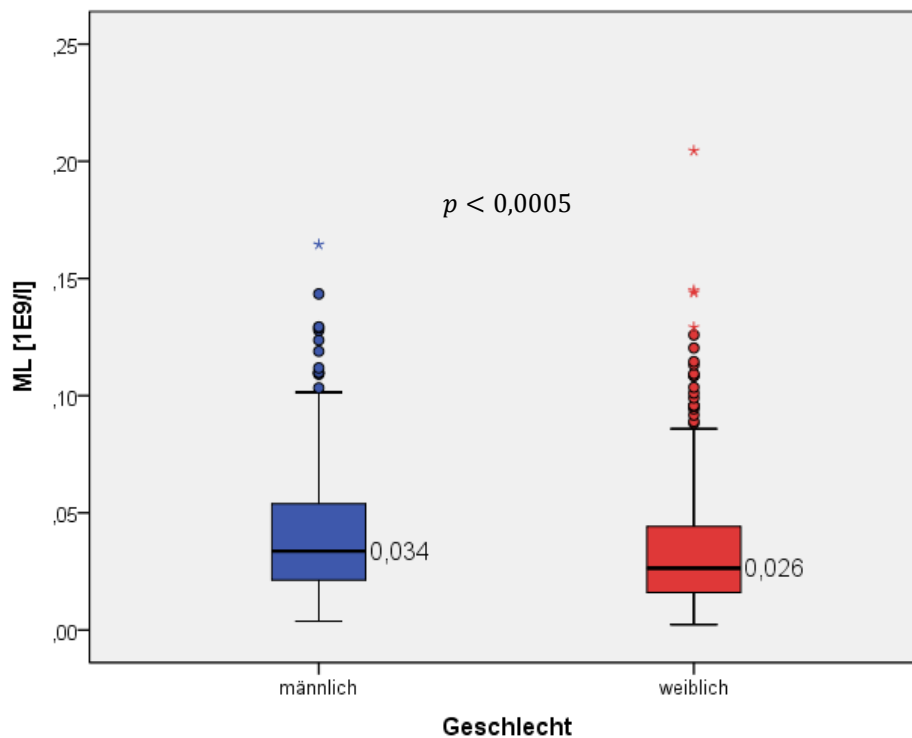


Abbildung 13: Boxplot der Monozyten-ähnlichen Zellen (absolute Zellzahlen) getrennt nach Geschlecht mit Angabe der Mediane als Lagemaß. n (männlich) = 403; n (weiblich) = 463.

4.2 Altersabhängigkeit

Wie das Geschlecht konnte auch von allen teilnehmenden Probanden das Alter erfasst werden. Daher konnten in der Auswertung des Merkmals Alter je nach Zellpopulation 866 bis 869 Datensätze herangezogen werden.

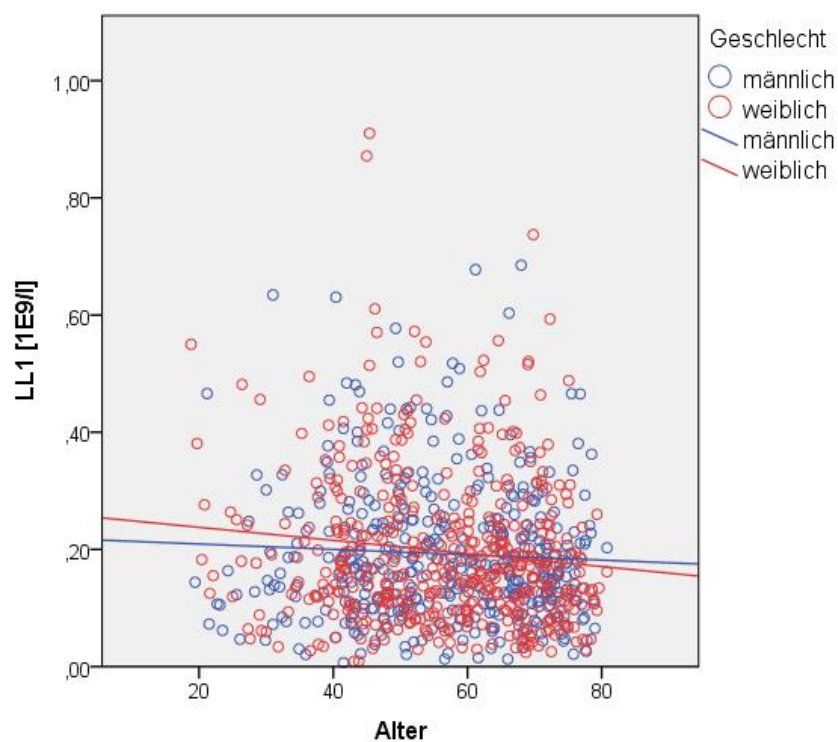


Abbildung 14: Darstellung der Zellzahl der LL1 ($CD3^+ CD16/56^+$) in Abhängigkeit vom Alter mit hinzugefügter linearer Regressionsgeraden unterteilt nach Geschlecht.

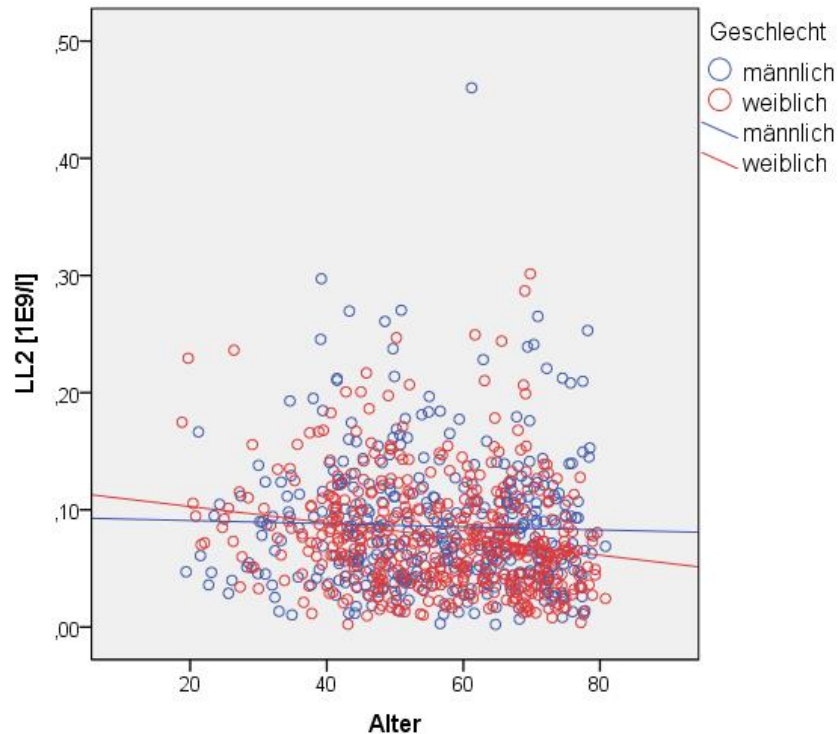


Abbildung 15: Darstellung der Zellzahl der LL2 ($CD8^+ CD4^-$) in Abhängigkeit vom Alter mit hinzugefügter linearer Regressionsgeraden unterteilt nach Geschlecht.

4.3 Abhängigkeit von der Waist-to-Hip Ratio (WHR)

Bezüglich der WHR gab es von 869 Probanden 816 gültige Werte, wodurch 93,9 % der ausgewerteten Datensätze diesbezüglich untersucht werden konnten. Die Geschlechtsabhängigkeit der WHR ist in Abbildung 16 deutlich zu sehen. Der Mittelwert und die Standardabweichung der WHR beträgt für Männer $0,98 \pm 0,073$ und für Frauen $0,86 \pm 0,066$. Ein t -Test für unabhängige Stichproben, welcher aufgrund einer hinreichenden Normalverteilung der Daten durchgeführt werden konnte (siehe Abbildung 28 im Anhang), ergibt einen p -Wert $< 0,0001$ und damit einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen WHR und Geschlecht.

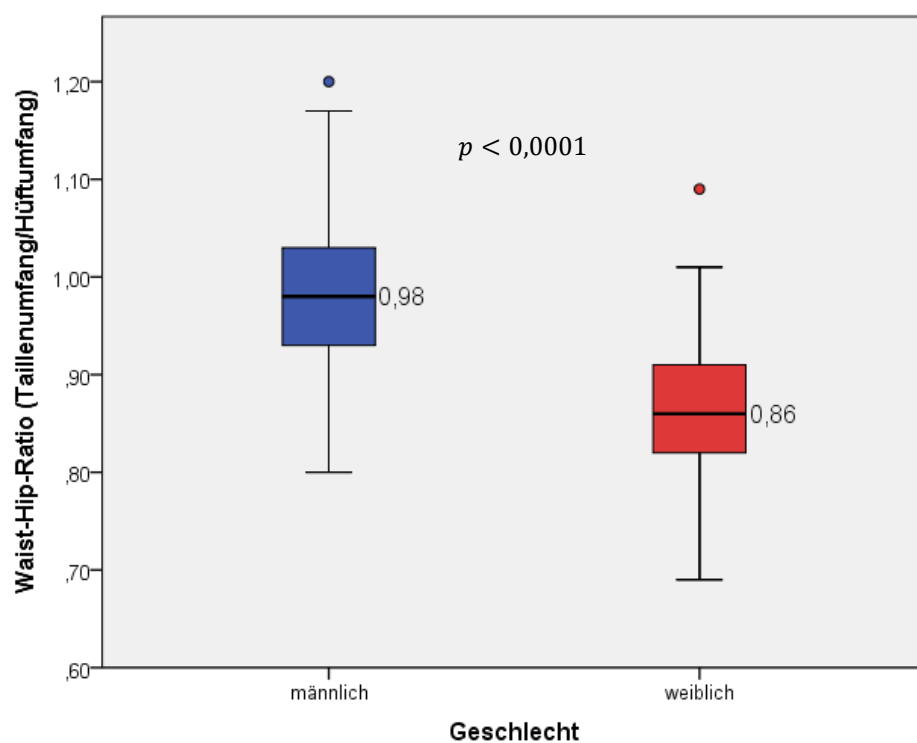


Abbildung 16: Darstellung der WHR getrennt nach Geschlecht von 816 Probanden (männlich: 382, weiblich: 434) mit Angabe der Mediane als Lagemaß.

In Tabelle 10 sind die Korrelationskoeffizienten sowie deren 95 % Konfidenzintervalle für den Zusammenhang zwischen Zellzahlen und WHR geschlechtergetrennt dargestellt. Einen signifikanten Zusammenhang gibt es zwischen den Lymphozyten-ähnlichen Zellen 2 (LL2; $CD8^+ CD4^-$) und der WHR beim weiblichen Geschlecht. Hierbei nimmt die Zellzahl mit zunehmender WHR ab (siehe Abbildung 17), wobei die Stärke des Zusammenhangs sehr gering ist, wie man an der heterogenen Verteilung der Zellzahlen der LL2 über die WHR sieht. In Abbildung 17 ist außerdem die deutliche Geschlechtsabhängigkeit der WHR zu sehen. Bei Männern scheint es laut Korrelationskoeffizient einen geringen Trend zur Zunahme der Zellzahl bei zunehmender WHR bei

allen untersuchten Zellpopulationen zu geben, wobei kein signifikantes Ergebnis feststellbar ist.

Tabelle 10: Auflistung der Korrelationskoeffizienten mit 95 % Konfidenzintervall bezüglich des Zusammenhangs zwischen Zellzahl und WHR (signifikante Korrelationskoeffizienten grau unterlegt); (*n*) Grundgesamtheit für das jeweilige Geschlecht.

	männlich			weiblich		
Zell-population	<i>n</i>	Korrelation nach Pearson	95 % Konfidenzintervall mittels Bootstrap*	<i>n</i>	Korrelation nach Pearson	95 % Konfidenzintervall mittels Bootstrap*
LL1	382	0,052	[-0,051; 0,155]	434	-0,046	[-0,132; 0,046]
LL2	382	0,015	[-0,095; 0,120]	434	-0,129	[-0,220; -0,038]
N/LL2	382	0,089	[-0,019; 0,186]	434	0,172	[-0,098; 0,244]
LL3	381	0,042	[-0,066; 0,148]	434	-0,005	[-0,090; 0,080]
N/LL3	381	0,041	[-0,069; 0,149]	434	0,067	[-0,024; 0,158]
ML	381	0,067	[-0,038; 0,169]	432	-0,020	[-0,116; 0,077]
* Bootstrap-Ergebnisse mit Hilfe von 1000 Bootstrap Stichproben						

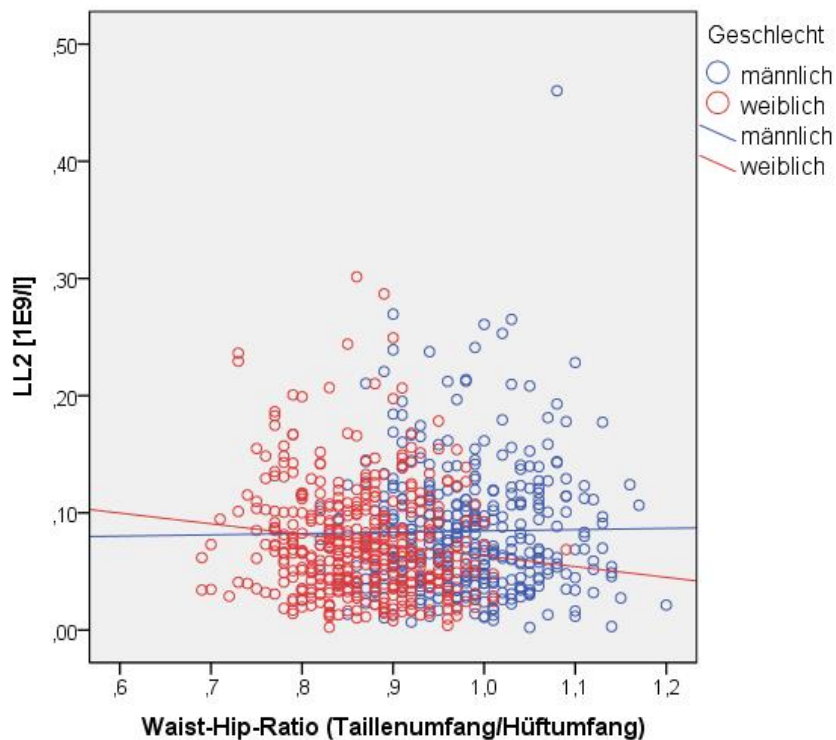


Abbildung 17: Darstellung der Zellzahl der LL2 ($CD8^+ CD4^-$) in Abhängigkeit von der WHR mit hinzugefügter linearer Regressionsgeraden unterteilt nach Geschlecht.

4.4 Abhängigkeit vom Cholesterinspiegel

Bezüglich des Cholesterinspiegels wurden die laborchemischen Parameter HDL und LDL von 820 der 869 durchflusszytometrisch verwertbaren Blutproben bestimmt. Damit ist eine Auswertung von 94,4 % der zur Verfügung stehenden Daten möglich. Ein Geschlechtsunterschied ist bei diesen Merkmalen nicht zu erwarten. Dennoch werden die Auswertungen geschlechtergetrennt vorgenommen (siehe Abschnitt 4.1).

4.4.1 HDL

Die HDL-Werte der 820 Probanden sind annähernd normalverteilt. Der Mittelwert und die Standardabweichung in dieser Kohorte beträgt für Männer $1,63 \pm 0,48$ mmol/l und für Frauen $1,65 \pm 0,51$ mmol/l. Eine grafische Darstellung ist in den Anlagen (Abbildung 29, Abbildung 30) zu finden.

In Tabelle 11 sind die Korrelationskoeffizienten und deren 95 % Konfidenzintervalle für den Zusammenhang zwischen HDL und Zellzahl der untersuchten Zellpopulationen aufgelistet. Eine signifikante Abhängigkeit konnte nicht gefunden werden.

Tabelle 11: Auflistung der Korrelationskoeffizienten mit 95 % Konfidenzintervall bezüglich des Zusammenhangs zwischen Zellzahl und HDL. (*n*) Grundgesamtheit für das jeweilige Geschlecht.

	männlich			weiblich		
Zell-population	<i>n</i>	Korrelation nach Pearson	95 % Konfidenzintervall mittels Bootstrap*	<i>n</i>	Korrelation nach Pearson	95 % Konfidenzintervall mittels Bootstrap*
LL1	381	0,065	[-0,025; 0,172]	439	-0,023	[-0,110; 0,074]
LL2	381	0,084	[-0,020; 0,194]	439	0,004	[-0,086; 0,098]
N/LL2	381	-0,047	[-0,115; 0,027]	439	-0,003	[-0,073; 0,101]
LL3	380	0,101	[-0,011; 0,211]	439	-0,016	[-0,112; 0,088]
N/LL3	380	-0,090	[-0,180; 0,130]	439	0,066	[-0,025; 0,161]
ML	380	0,021	[-0,071; 0,124]	437	-0,023	[-0,132; 0,099]
* Bootstrap-Ergebnisse mit Hilfe von 1000 Bootstrap Stichproben						

4.4.2 LDL

Bezüglich des LDL-Wertes konnte von einer annähernden Normalverteilung unter den 820 untersuchten Probanden ausgegangen werden. Eine grafische Darstellung der Lage- und Streumaße dieses Wertes ist in den Anlagen (Abbildung 31, Abbildung 32) zu fin-

den. Der Mittelwert und die Standardabweichung betragen in der untersuchten Kohorte für Männer $3,48 \pm 0,95$ mmol/l und für Frauen $3,49 \pm 0,99$ mmol/l.

Für die Zellzahl der untersuchten Zellarten konnte bezüglich der Abhängigkeit vom LDL kein signifikanter Nachweis erbracht werden (siehe 95 % Konfidenzintervalle in Tabelle 12). Außerdem sind die Beträge der Korrelationskoeffizienten für alle Zellarten und beide Geschlechter deutlich kleiner als 0,1.

Tabelle 12: Auflistung der Korrelationskoeffizienten mit 95 % Konfidenzintervall bezüglich des Zusammenhangs zwischen Zellzahl und LDL. (*n*) Grundgesamtheit für das jeweilige Geschlecht.

Zell- population	männlich			weiblich		
	<i>n</i>	Korrelation nach Pear- son	95 % Konfidenz- intervall mittels Bootstrap*	<i>n</i>	Korrelation nach Pear- son	95 % Konfidenz- intervall mittels Bootstrap*
LL1	381	-0,001	[-0,090; 0,088]	439	0,006	[-0,097; 0,104]
LL2	381	-0,005	[-0,097; 0,089]	439	0,042	[-0,065; 0,151]
N/LL2	381	-0,050	[-0,100; 0,053]	439	-0,016	[-0,102; 0,064]
LL3	380	-0,001	[-0,081; 0,100]	439	-0,030	[-0,124; 0,063]
N/LL3	380	0,038	[-0,049; 0,129]	439	0,018	[-0,067; 0,107]
ML	380	-0,049	[-0,128; 0,038]	437	0,044	[-0,061; 0,155]
* Bootstrap-Ergebnisse mit Hilfe von 1000 Bootstrap Stichproben						

4.5 Abhängigkeit vom Lebensstil

4.5.1 Rauchstatus

Der Rauchstatus wurde von 786 der 869 Probanden, also insgesamt von 90,4 % angegeben. Hiervon sind 53,7 % weiblichen und 46,3 % männlichen Geschlechts. Dies entspricht etwa der Geschlechtsverteilung aller Probanden, welche zytometrisch erfasst wurden. Die Anzahl der Probanden in den drei Gruppen Nichtraucher, ehemalige und gegenwärtige Raucher ist in Tabelle 13 sowie grafisch in Abbildung 18 A dargestellt.

Tabelle 13: Anzahl der Probanden bezüglich des Rauchstatus getrennt nach Geschlecht.

Rauchstatus	männlich	weiblich	Gesamt
Nichtraucher	158	266	424
Ehemalige Raucher	125	87	212
Gegenwärtige Raucher	81	69	150
Gesamt	364	422	786

Zur besseren Aussagekraft der Repräsentativität des erhobenen Rauchstatus für die deutsche Bevölkerung wurde mit Hilfe der Daten bezüglich des Rauchstatus der Mikrozensus des Statistischen Bundesamtes von 2013 herangezogen [49] und eine exemplarische Gegenüberstellung der grafischen Darstellungen vorgenommen (Abbildung 18).

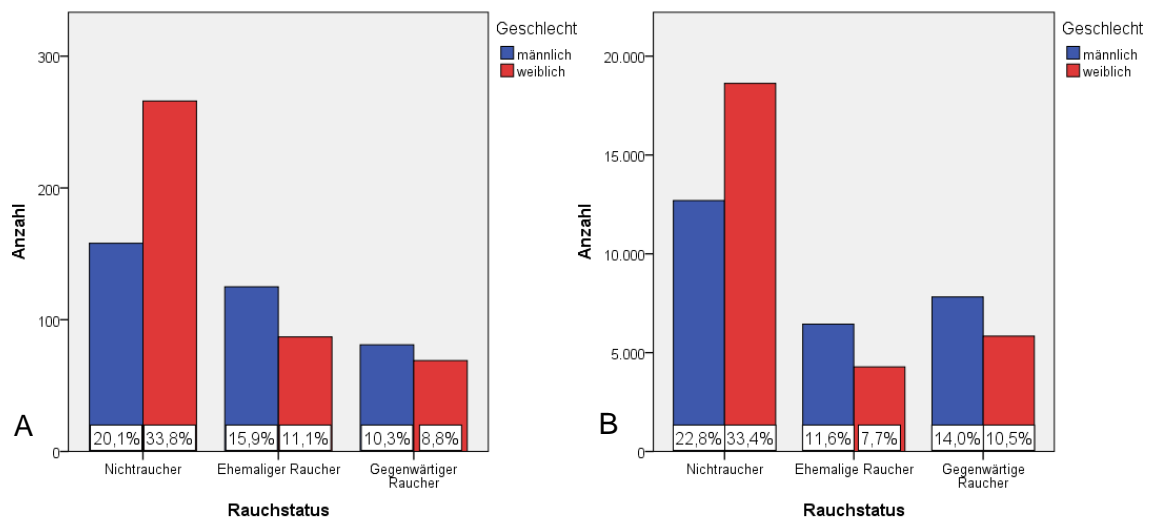


Abbildung 18: Darstellung des Rauchstatus getrennt nach Geschlecht für (A) 786 Probanden der LIFE-Studie und (B) 55.693 Datensätze aus dem Mikrozensus 2013 des Statistischen Bundesamtes [49].

Mit Hilfe des Globaltests nach Kruskal-Wallis wurde nach einem Zusammenhang zwischen dem Rauchstatus der Probanden und deren Zellzahl für jede einzelne Zellpopulation gesucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zu finden. Die Nullhypothese, die Verteilung der Zellen sei über allen Kategorien des Rauchstatus gleich, konnte für die LL2 ($CD8^+ CD4^-$) bei Männern auf dem festgelegten Signifikanzniveau von 0,0071 (siehe Abschnitt 3.3) abgelehnt werden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer genaueren Betrachtung, zwischen welchen Gruppen ein Unterschied bezüglich der Zellzahl besteht. Die Ergebnisse der Post-hoc Testung mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests sind in Tabelle 15 dargestellt. Dabei wurden die drei anfänglich festgelegten Gruppen einzeln miteinander sowie der aktuelle Rauchstatus (Nichtraucher und ehemalige Raucher

in der Gruppe der gegenwärtigen Nichtraucher gegenüber den gegenwärtigen Rauchern) getestet. Hierbei kann ein signifikanter Unterschied bezüglich der Zellzahlen der LL2 bei Männern zwischen den ehemaligen Rauchern und den gegenwärtigen Rauchern bzw. zwischen den gegenwärtigen Rauchern und den gegenwärtigen Nichtrauchern festgestellt werden. In Abbildung 19 ist mit Hilfe von Boxplots die Verteilung der Zellzahlen in den jeweiligen Kategorien des Rauchstatus dargestellt. Hierbei lässt sich eine höhere Anzahl an $CD8^+ CD4^-$ Zellen bei gegenwärtigen Rauchern feststellen ($\tilde{x}_{\text{gegenwärtige Nichtraucher}} = 0,069 \cdot \frac{10^9}{1}$, $\tilde{x}_{\text{gegenwärtige Raucher}} = 0,086 \cdot \frac{10^9}{1}$).

Tabelle 14: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests auf Unterschiedlichkeit der Zellzahlen in den Untergruppen des Rauchstatus für Männer und Frauen getrennt. (NR) Nichtraucher (ER) Ehemalige Raucher (GR) Gegenwärtige Raucher.

	männlich				weiblich			
Zellpopulation	n			p	n			p
	NR	ER	GR		NR	ER	GR	
LL1	158	125	81	0,014	266	87	69	0,521
LL2	158	125	81	0,007	266	87	69	0,405
N/LL2	158	125	81	0,342	266	87	69	0,714
LL3	157	125	81	0,083	266	87	69	0,765
N/LL3	157	127	81	0,531	266	87	69	0,661
ML	157	125	81	0,099	265	87	68	0,208

Tabelle 15: Ergebnisse der Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der Anzahl der LL2 und dem Rauchstatus von männlichen Probanden. (NR) Nichtraucher (ER) Ehemalige Raucher (GR) Gegenwärtige Raucher.

Getestete Gruppen	p
Nichtraucher : Ehemaliger Raucher	0,230
Nichtraucher : Gegenwärtiger Raucher	0,023
Ehemaliger Raucher : Gegenwärtiger Raucher	0,002
Gegenwärtiger Nichtraucher (NR + ER) : Gegenwärtiger Raucher	0,003

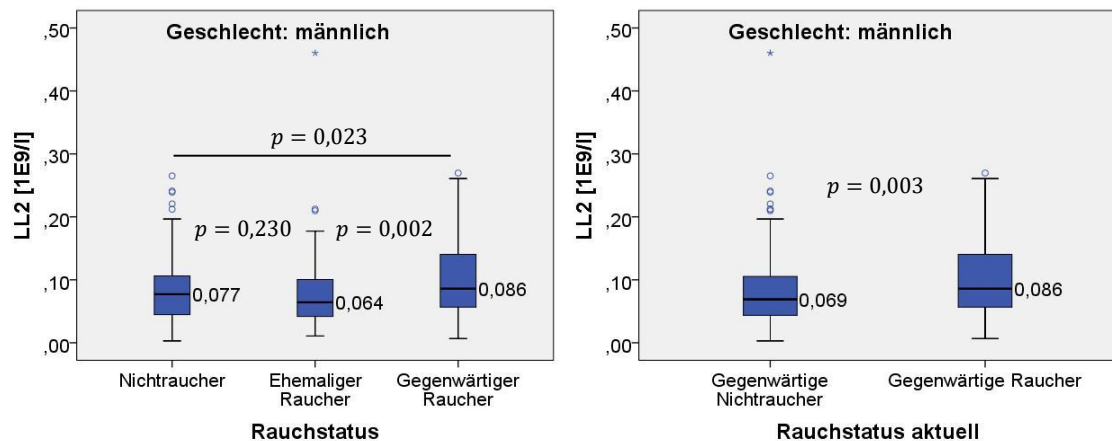


Abbildung 19: Boxplots zur Darstellung der Verteilung der Zellzahlen der LL2 bei Männern in Abhängigkeit vom Rauchstatus mit Angabe der Mediane als Lagemaß.

4.5.2 Alkoholaufnahme

Bezüglich der Alkoholaufnahme gaben 82,6 % (718 der 869 Probanden) ihren täglichen Konsum an. Die Geschlechterverteilung blieb annähernd gleich der Ausgangskohorte mit einem Anteil von 54,7 % Frauen und 45,3 % Männern. Die Verteilung der Probanden in die drei festgelegten Gruppen ist in Tabelle 16 aufgelistet. In Abbildung 20 ist dies, sowie die Alkoholaufnahme in Gramm pro Tag, nach anamnestischen Angaben grafisch dargestellt. Hierbei wird auch der Unterschied zwischen den Geschlechtern deutlich. Der Median für die Alkoholaufnahme beträgt für Frauen 2 g/d und für Männer 15 g/d. Bei den getesteten Zellarten konnte weder bei Männern, noch bei Frauen ein signifikanter Unterschied der Zellzahlen in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum festgestellt werden (siehe Tabelle 17).

Tabelle 16: Anzahl der Probanden bezüglich der Alkoholaufnahme pro Tag in drei Gruppen unterteilt getrennt nach Geschlecht.

Alkoholaufnahme	männlich	weiblich	Gesamt
Risikoarmer Konsum	233	365	598
Riskanter Konsum	66	21	87
Gefährlicher bzw. hochgefährlicher Konsum	26	7	33
Gesamt	325	393	718

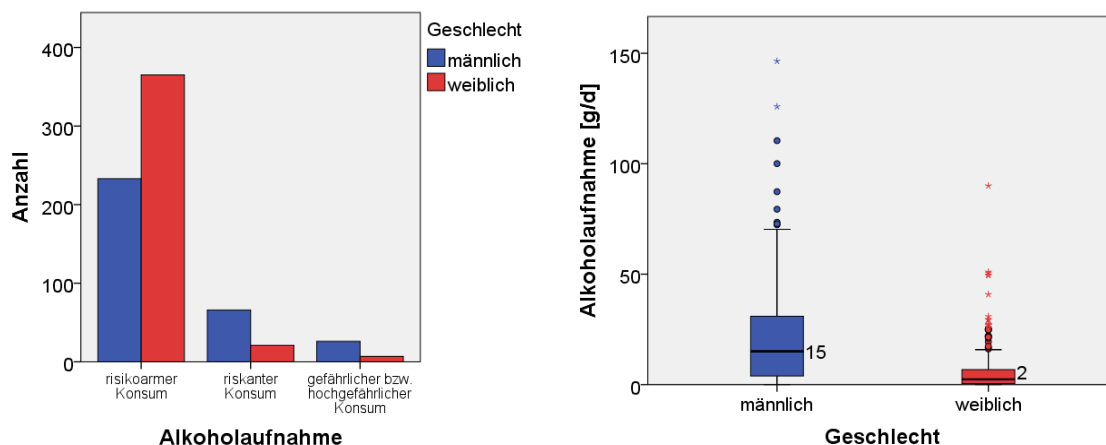


Abbildung 20: Darstellung der Anzahl der Probanden in den drei Gruppen bezüglich der Alkoholaufnahme geschlechtergetrennt sowie Darstellung der Alkoholaufnahme in Gramm pro Tag mit Angabe des Median.

Tabelle 17: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests auf Unterschiedlichkeit der Zellzahlen in den Untergruppen des Alkoholkonsums geschlechtergetrennt. (AK) Risikoarmer Konsum (RK) Riskanter Konsum (GK) Gefährlicher bzw. hochgefährlicher Konsum.

	männlich				weiblich			
Zellpopulation	n			p	n			p
	AK	RK	GK		AK	RK	GK	
LL1	233	66	26	0,302	365	21	7	0,264
LL2	233	66	26	0,158	365	21	7	0,814
N/LL2	233	66	26	0,100	365	21	7	0,790
LL3	232	66	26	0,681	365	21	7	0,103
N/LL3	232	66	26	0,396	365	21	7	0,275
ML	232	66	26	0,722	364	21	6	0,226

4.6 Abhängigkeit von arterieller Hypertonie

Die Merkmalsausprägung des Bluthochdrucks konnte von 74,2 % (645 von 869 Probanden; 47,3 % Männer, 52,7 % Frauen) erhoben werden. Die Anzahl der Probanden in den jeweiligen Gruppen ist in Tabelle 18 zu sehen. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests aufgelistet, wobei ein signifikanter Unterschied der $CD8^+$ $CD4^-$ Zellzahl sowie des Neutrophilen/LL2 und Neutrophilen/LL3 Verhältnisses in den einzelnen Gruppen dieses Merkmals bei Frauen feststellbar ist.

Tabelle 18: Anzahl der Probanden bezüglich des Bluthochdrucks in drei Gruppen unterteilt getrennt nach Geschlecht.

Bluthochdruck	männlich	weiblich	Gesamt
Kein Bluthochdruck	166	215	381
Bekannter Bluthochdruck	114	111	225
Hypertoner Messwert ohne vorherige Bluthochdruckdiagnose	25	14	39
Gesamt	305	340	645

Tabelle 19: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests auf Unterschiedlichkeit der Zellzahlen in den Kategorien des Hypertonus für Männer und Frauen getrennt. (KH) Kein Bluthochdruck (BH) Bekannter Bluthochdruck (HM) Hypertoner Messwert ohne vorherige Bluthochdruckdiagnose.

	männlich				weiblich			
Zellpopulation	<i>n</i>			<i>p</i>	<i>n</i>			<i>p</i>
	KH	BH	HM		KH	BH	HM	
LL1	166	114	25	0,996	215	111	14	0,108
LL2	166	114	25	0,774	215	111	14	0,006
N/LL2	166	114	25	0,031	215	111	14	< 0,001
LL3	165	114	25	0,918	215	111	14	0,068
N/LL3	165	114	25	0,761	215	111	14	0,003
ML	165	114	25	0,044	213	111	14	0,370

In der anschließenden Post-hoc Testung konnte ein signifikanter Unterschied bei den weiblichen Probanden ohne Bluthochdruck gegenüber den Probanden mit bekanntem Bluthochdruck für die LL2 ($p = 0,004$) sowie das Neutrophilen/LL2 ($p < 0,0001$) und Neutrophilen/LL3 Verhältnis ($p = 0,001$) bestätigt werden (siehe Tabelle 20). Die grafische Darstellung der signifikanten Ergebnisse ist in Abbildung 21 zu finden.

Tabelle 20: Ergebnisse der Post-hoc Testung für weibliche Probanden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests zwischen den jeweiligen Gruppen des Merkmals der Hypertonie auf Unterschiedlichkeit bezüglich der LL2-Zellzahl bzw. des Neutrophilen/LL2 und Neutrophilen/LL3 Verhältnisses.

Getestete Gruppen	<i>p</i>		
	LL2	N/LL2	N/LL3
Kein Bluthochdruck : Bekannter Bluthochdruck	0,004	< 0,0001	0,001
Bekannter Bluthochdruck : Hypertoner Messwert ohne vorherige Bluthochdruckdiagnose	0,501	0,888	0,159
Kein Bluthochdruck : Hypertoner Messwert ohne vorherige Bluthochdruckdiagnose	0,068	0,070	0,884

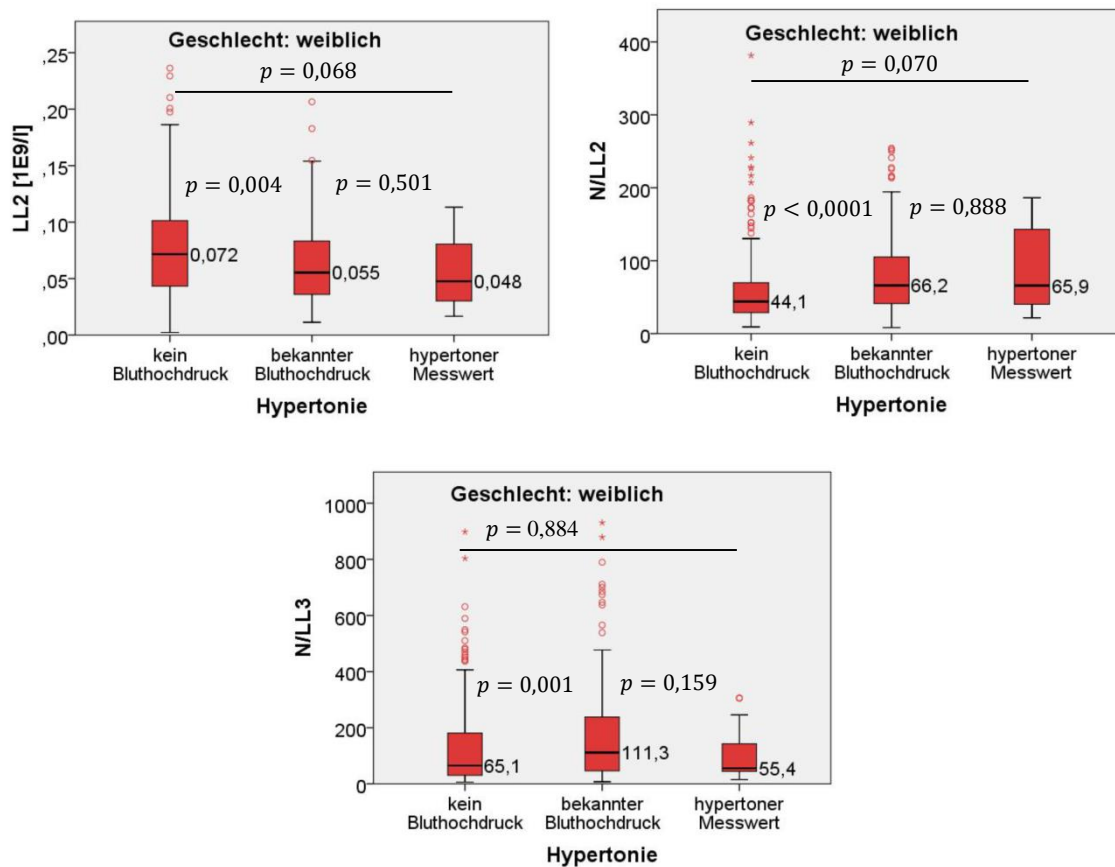


Abbildung 21: Darstellung der jeweiligen Zellzahlen bzw. Verhältnisse in den Gruppen des Merkmals der Hypertonie für weibliche Probanden mit Angabe des Median mittels Boxplot.

5 Diskussion

5.1 Bewertung der Methodik

5.1.1 Probandenauswahl und Merkmalsanalyse

Das Probandenkollektiv der für diese Arbeit verwendeten Daten entstammt der LIFE-Adult Kohorte, was den Vorteil eines großen Stichprobenumfangs aufweist. Eine repräsentative Verteilung der Probanden wurde anhand der randomisierten Zuweisung des Einwohnermeldeamtes von Leipzig sowie der alters- und geschlechtsstratifizierten Messungen erzielt. Eine große Anzahl an Probanden sowie eine Gleichverteilung zwischen den Geschlechtern konnte in den Altersgruppen der 40 bis 79-Jährigen erzielt werden, welche mit der LIFE-Studie erfasst werden sollten. Die Probanden im Alter von 18 bis 39 Jahren sind dagegen unterrepräsentiert (siehe Tabelle 7, Abbildung 11 in 3.2.6), da diese nicht als Zielgruppe der LIFE-Studie definiert wurden, sondern im Nachhinein zusätzlich durch die Pilotstudie eingeschlossen wurden. Aufgrund dieses Ungleichgewichts zwischen den Altersgruppen sowie fehlender Korrelationen bei den männlichen Probanden wurde unter anderem auf eine altersabhängige Analyse des Zusammenhangs zwischen Zellzahlen und untersuchten Merkmalen verzichtet. Probanden mit schweren chronischen Erkrankungen wurden von der Studie ausgeschlossen (siehe Tabelle 6 in 3.2.6). Hierbei sollte jedoch erwähnt werden, dass Probanden mit einem einmaligen episodischen Ereignis in der Anamnese (zum Beispiel Herzinfarkt oder Schlaganfall) nicht ausgeschlossen wurden und somit eine Ergebnisbeeinflussung möglich ist. Anamnestisch konnte bei 6,9 % (26 von 376) der männlichen sowie bei 3,3 % (14 von 423) der weiblichen Probanden ein ärztlich diagnostizierter Herzinfarkt oder Schlaganfall festgestellt werden, sodass die Fallzahl dieser möglichen Fehlerquelle als gering zu bewerten ist.

Die WHR wurde während der körperlichen Untersuchung der Probanden von medizinischem Personal nach internationalen Standards der WHO erfasst und sollte daher als untersucherunabhängiger Wert betrachtet werden. Die WHR wurde als Merkmal gewählt, da diese eine stärkere Assoziation bezüglich des kardiovaskulären Risikos aufweist, als beispielsweise der BMI (engl. *body mass index*) [50]. Referenzwerte für die WHR sind für verschiedene ethnische Gruppen unterschiedlich [51]. Ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen für Europäer besteht laut WHO bei Männern ab 1,0 und bei Frauen ab 0,85. Für die in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden würde dies ein erhöhtes Risiko für 58 % der Frauen und 39 % der Männer bedeuten. Verglichen mit anderen Kohortenstudien sind die Mittelwerte der WHR der Probanden mit 0,98 für Männer und 0,86 für Frauen relativ hoch [52]. Dies erhärtet den Verdacht auf

ein bereits bestehendes erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen der eingeschlossenen Probanden.

Zur Beurteilung des Fettstoffwechsels wurden HDL und LDL gewählt, da diese bezüglich der Risikostratifizierung für kardiovaskuläre Erkrankungen herangezogen werden. Ein Beispiel hierfür ist der von der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie herausgegebene ESC-SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation*), mit welchem das Risiko für tödliche kardiovaskuläre Ereignisse auf Grund von Herzinfarkt, Schlaganfall oder peripherer Gefäßerkrankung über die nächsten zehn Jahre abgeschätzt werden kann. Hierzu werden das Geschlecht, Alter, Rauchstatus, Blutdruck und Gesamtcholesterin oder das Verhältnis von Gesamtcholesterin/HDL herangezogen [53]. Die Referenzbereiche für die Cholesterinwerte sind geschlechtsunabhängig und werden von verschiedenen Institutionen als Empfehlungen in Abhängigkeit von der Anzahl an Risikofaktoren beschrieben [54]. Laut Deutscher Gesellschaft zur Bekämpfung von Fettstoffwechselstörungen und ihren Folgeerkrankungen DGFF (Lipid-Liga) e.V. sowie nach den Leitlinien des National Cholesterol Education Program (NCEP) sollten HDL-Werte größer als 1,55 mmol/l und LDL Werte kleiner als 4,2 mmol/l sein. Bei erhöhter Anzahl an Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen ist der LDL Zielwert jedoch abhängig von der Anzahl der Risikofaktoren niedriger anzusetzen [54; 55]. Die Probanden, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, liegen geschlechtsunabhängig mit einem HDL-Mittelwert von 1,6 mmol/l und einem LDL-Mittelwert von 3,5 mmol/l innerhalb der Referenzbereiche und sind vergleichbar mit anderen Kohortenstudien in Deutschland [56; 57]. Bei den Frauen liegen bezüglich des LDLs 28 %, bzw. bezüglich des HDLs 44 % außerhalb der Referenzwerte. Bei den Männern beträgt der Anteil an LDL-Werten > 4,2 mmol/l 26 % und an HDL-Werten < 1,55 mmol/l 48 %. Auch dies bestätigt den relativ hohen Anteil an Probanden mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko.

Die Merkmalsanalyse bezüglich des Lebensstils (Alkoholkonsum, Rauchstatus) der Probanden wurde anamnestisch erfragt, was kritisch betrachtet werden sollte. Aufgrund der gesellschaftlichen Stigmatisierung auffälligen Verhaltens diesbezüglich sollte eine fehlerhafte Angabe insbesondere der erhöhten Alkoholaufnahme in Betracht gezogen werden. Dies wird auch deutlich durch die vergleichsweise geringe mittlere Alkoholaufnahme am Tag der in dieser Arbeit herangezogenen Daten von 12,4 g. Laut Deutscher Hauptstelle für Suchtfragen e.V. betrug diese in Deutschland 2013 rund 21,3 Gramm pro Einwohner [58].

Mit Hilfe der medizinischen Anamnese wurden von den Probanden die Merkmalsausprägungen bekannter beziehungsweise kein Bluthochdruck erfragt. Durch die Blutdruckmessung am Untersuchungstag konnte eine dritte Merkmalsausprägung erfasst werden, welche Probanden beinhaltet, bei welchen in der Messung ein Wert größer als 140/90 mmHg ohne bekannten Hypertonus festgestellt wurde. Diese Gruppe wurde aufgrund eines definierten Bluthochdrucks ab genanntem Wert differenziert [59]. Es sollte

jedoch bedacht werden, dass es sich hierbei um eine Einmalmessung handelt. In der besagten Untergruppe kann weiterhin eine vergleichsweise sehr geringe Probandenanzahl festgestellt werden (siehe Tabelle 18 in 4.6), was eine Beeinflussung des statistischen Ergebnisses nach sich ziehen kann.

5.1.2 Probenaufbereitung

Die Blutprobenabnahme sowie Aufbereitung liefen nach einem festen Schema ab, um subjektive Fehlerquellen zu vermeiden. Zu diesem Schema gehörte unter anderem die Blutentnahme zwischen 6 und 12 Uhr, um tageszeitabhängige Effekte auf die Blutzusammensetzung zu vermeiden. Außerdem wurden die Proben innerhalb von zwei bis vier Stunden aufbereitet und maximal 48 Stunden gelagert, um mögliche Schäden hierdurch zu minimieren [46; 43]. Aufgrund des standardisierten Ablaufs wurden keine spezifischen Tests zur Untersuchung möglicher Fehler während der manuellen Einzelschritte der Probenaufbereitung durchgeführt. Weiterhin ist aufgrund der hohen Fallzahl eine gewisse Kompensation möglicher probenspezifischer Effekte zu erwarten.

Bezüglich der Zellisolation wurde sich für die Erythrozyten-Lyse-Methode entschieden, um eine optimale Konservierung der Morphologie der Leukozyten und damit zytometrische Analyse dieser zu ermöglichen. Der erhöhte Arbeits- und Zeitaufwand wird durch die genauere Abgrenzung von Leukozyten gegenüber Erythrozytentrümmern und damit eine genauere Untersuchung kompensiert. Eine andere Methode, um mononukleäre Zellen des peripheren Blutes isolieren und analysieren zu können, ist die Dichtegradientenzentrifugation, welche als Nachteil den Verlust eventuell bedeutsamer Zellen aufweist [60] und daher hier nicht angewandt wurde.

5.1.3 Blut als Lieferant für Biomarker bei kardiovaskulären Erkrankungen

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Festlegung potenzieller neuer Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen. Biomarker sind dabei charakteristische biologische Merkmale zum Beispiel für normale biologische Prozesse oder einen krankhaften Prozess, welche objektiv gemessen werden können [61]. Wichtige Merkmale für einen guten Biomarker sind hierbei auch die Reliabilität (Zuverlässigkeit) sowie die Validität (Gültigkeit) der Messmethodik. Es können unter anderem Gene, verschiedene Moleküle wie Enzyme oder Hormone, oder auch Zellen eingesetzt werden. Diese können als prognostische Marker als Risikoindikator oder beispielsweise als diagnostische Marker zur Feststellung der Erkrankung dienen. Blut eignet sich besonders gut als Ausgangsmaterial für zukünftige Biomarker, da dieses leicht zugänglich ist und wenig Invasivität erfordert.

Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen sind auf Grund der Bedeutung dieser Erkrankungsgruppe in unserer Gesellschaft von besonderem Interesse. Da Leukozyten in der Entstehung der Arteriosklerose eine entscheidende Rolle spielen, wurde in dieser Arbeit

die Möglichkeit der Etablierung potentieller Subpopulationen als prognostische Marker gesucht. Durch Schädigung von Endothelzellen können die im Blut zirkulierenden Leukozyten sowie Lipoproteine in den subendothelialen Raum gelangen. Die Leukozyten können hier durch verschiedene Cytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ oder Interleukine wie IL-1 und IL-6 eine inflammatorische Reaktion auslösen. Bereits beschriebene Biomarker für die Arteriosklerose sind zum Beispiel das von Leukozyten gebildete Lp-PLA2 (Lipoprotein-assoziierte Phospholipase A2), welches vor allem für die Plaquestabilität und Stratifizierung des individuellen Risikos herangezogen wird [62; 63]. Ein anderes Beispiel ist die Myeloperoxidase (MPO), welches ein Enzym aus azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten darstellt. Dies ist ein Marker für das Ausmaß der Endothelschädigung [64; 65]. Diese Beispiele zeigen die bisherige Bedeutung der im Blut zirkulierenden Leukozyten für die Risikostratifizierung bei kardiovaskulären Erkrankungen. Mit der Beschreibung einer neuen Leukozytensubpopulation als prognostischem Marker könnte dies weiter ausgebaut werden.

5.1.4 Analyse mittels Durchflusszytometrie und manuellem Gating

Für eine durchflusszytometrische Analyse mit fluoreszenzmarkierten Oberflächenproteinen ist die Suche nach geeigneten Antikörpern notwendig. Hierbei müssen vor allem die unterschiedlichen Eigenschaften, insbesondere das Bindungsverhalten beachtet werden. In dieser Arbeit wurde sich für monoklonale Antikörper entschieden, welche gegenüber polyklonalen Antikörpern den Vorteil der höheren Spezifität aufweisen. Werden Antigene gewählt, welche hoch exprimiert werden, führt dies zu einer Verstärkung der Fluoreszenzintensität. Dies spiegelt sich in der Verteilungskurve der Punktwolken im Dotplot wieder und ermöglicht eine leichtere Abgrenzung gegenüber negativen Zellen. Diese können aufgrund von Autofluoreszenz oder unspezifischen Bindungen auch eine geringe Fluoreszenzintensität aufweisen und die Ergebnisse so beeinflussen und verfälschen. In dieser Arbeit waren auch Antigene mit geringer Expressionsdichte von besonderem Interesse, was eine optimale Kombination der bindenden Antikörper mit geeigneten Farbstoffen erfordert. Optimale Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten sowie die Kombination unterschiedlicher Antikörper mit einem Farbstoff wurden durch wiederholte Testung im Fluoreszenzverhalten gefunden [43].

Ein Nachteil des manuellen Gatings ist die individuelle Auswertung der Ergebnisse und damit die eingeschränkte Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Untersucher. Um diese Fehlerquelle so gering wie möglich zu halten, wurden die individuellen Gatingfähigkeiten innerhalb der Arbeitsgruppe geschult sowie getestet. Die Möglichkeit einer automatischen Analyse hat in den letzten zehn Jahren enorme Fortschritte gemacht [66–68]. Durch diese Innovation ist eine objektive und vor allem schnellere Analyse der Zellen möglich [69]. Ein weiterer Vorteil besteht in der Detektion bisher unbekannter Zellpopulationen, was gerade für diese Arbeit interessant wäre. Mit Hilfe mathemati-

scher Algorithmen können bestimmte Trends erfasst und ausgegeben werden [70], beim manuellen Gating wiederum kann nur durch gezieltes Suchen oder zufällig eine neue Population entdeckt werden. Die angewandte Gatingstrategie dieser Arbeit wird im Abschnitt 5.2.1 diskutiert.

5.1.5 Statistik

Bei den statistischen Ergebnissen ist zu beachten, dass die Korrelationskoeffizienten der stetigen Merkmale Alter, WHR, HDL und LDL nur dann als signifikant zu betrachten sind, wenn die 95 % Konfidenzintervalle die Null nicht enthalten.

Weiterhin sollte das Problem des mehrfachen Testens nicht außer Acht gelassen werden. Die sogenannte Alphafehler-Kumulierung besagt, je mehr Hypothesen man auf dem gleichen Datensatz prüft, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit, eine davon fehlerhaft als zutreffend anzunehmen [71, S. 2]. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Anpassung des Signifikanzniveaus von 0,05 auf 0,0071 mit Hilfe der Methode nach Bonferroni versucht zu beachten [48]. Es sollte jedoch bedacht werden, dass diese Korrektur lediglich für sieben Tests, und damit nur innerhalb der Testung einer Zellpopulation, also nicht global für alle durchgeführten Tests gilt. Es ist daher davon auszugehen, dass die Wahrscheinlichkeit, fälschlicherweise eine Hypothese anzunehmen, trotzdem mehr als 5 % beträgt. Weiterhin ist zu beachten, dass das Signifikanzniveau für die Konfidenzintervalle der Korrelationskoeffizienten nicht angepasst wurde.

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte die angewandte Methodik der univariaten Merkmalsanalyse bedacht werden. Eine vorhandene Koabhängigkeit verschiedener Merkmale wie zum Beispiel der WHR vom Alter und Geschlecht sollte bei weiterführenden Untersuchungen des Einflusses auf die Zellzahlen in multivariaten Analysen genauer differenziert werden.

5.2 Bewertung der Ergebnisse

5.2.1 Interpretation der Gatingresultate

Es wurde eine Gatingstrategie zur Beschreibung und Analyse von Lymphozyten- und Monozyten-ähnlichen Zellen im Granulozytenscatter entwickelt (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7 in 3.2.4). Die beschriebenen vier neuen Subpopulationen sollten nicht als eine reine Verunreinigung des Granulozytengates mit bisher bekannten Monozyten und Lymphozyten betrachtet werden, was durch die heterogene Verteilung der neuen Populationen im FS-H : CD45 Dotplot (siehe Abbildung 9) verdeutlicht wird. Diese Zellen wurden aus verschiedenen Gründen bisher nicht näher betrachtet. Typischerweise wird zur Analyse von Monozyten und Lymphozyten meist die Zellisolation mittels Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymeren (Markenname: Ficoll) durchgeführt, bei welcher die

PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, engl. *peripheral blood mononuclear cell*) als Ausgangsmaterial dienen. Hierbei gehen die stark granulierten Zellpopulationen im Granulozytenscatter verloren und werden damit bei der weiteren Auswertung außer Acht gelassen. Arbeiten mit Vollblut als Ausgangsmaterial, wie es in dieser Arbeit der Fall ist, sind in der Literatur seltener zu finden. Außerdem beginnt die Monozyten- bzw. Lymphozytenanalyse zunächst im $SS-H^{low-mid} CD45^+$ beziehungsweise im $SS-H^{low} CD45^+$ Gate. Die besagten Populationen liegen jedoch außerhalb, im $SS-H^{mid-high} CD45^+$ Bereich (siehe Abbildung 9).

Die angewandte Gatingstrategie dieser Arbeit beruht auf der einleitenden Entfernung von Störsignalen, Luftblasen, Zelltrümmern, Doubletten sowie $CD45^-$ Zellen, um alle Leukozyten zu isolieren. Nach Bocsi *et al.* [43] wurden die neutrophilen und eosinophilen Leukozyten dann mittels $SS-H^{mid-high}$ ermittelt. Aufgrund der fehlenden Literatur der in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Zellen musste die Gatingstrategie ab diesem Punkt neu entwickelt werden. Die Grundlagen zum Gating der Lymphozyten-ähnlichen Zellen wurden aus einem erweiterten T-Zell-Gating gewonnen [43; 72]. Hierbei stellte sich vor allem eine heterogene Verteilung der Ereignisse bei Abtragung von CD8 gegen CD4 dar. Aufgrund der deutlich abzugrenzenden Populationen der $CD4^+ CD8^-$ und $CD8^+ CD4^-$ wurde sich auf diese beiden Hauptpopulationen konzentriert. Eine Betrachtung der weiteren Subpopulationen ist aufgrund der geringen Ereignisanzahlen sehr fehleranfällig [22]. Für die ML wurden zuerst die Neutrophilen nach Bocsi *et al.* [43] analysiert, später wurden sie durch Positivität für CD38 von den LL abgegrenzt (siehe Abbildung 6 K und Abbildung 7 K in 3.2.4) [44]. Hier war eine Abgrenzung der Gates bei einigen Probanden problematisch. Exemplarisch ist in Abbildung 22 das Gatingergebnis eines Probanden mit einer kaum vorhandenen Population an ML dargestellt. Einzelne schlecht auswertbare Datensätze sollten in der Fehlerbetrachtung und damit in der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden.

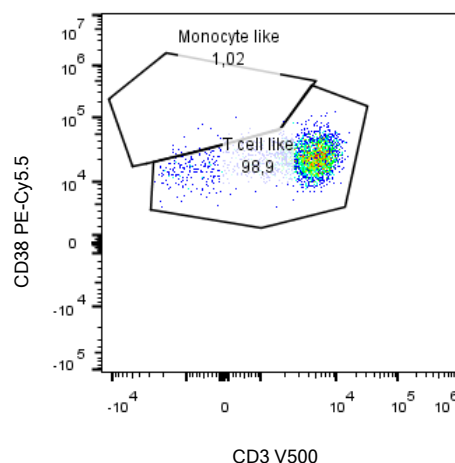
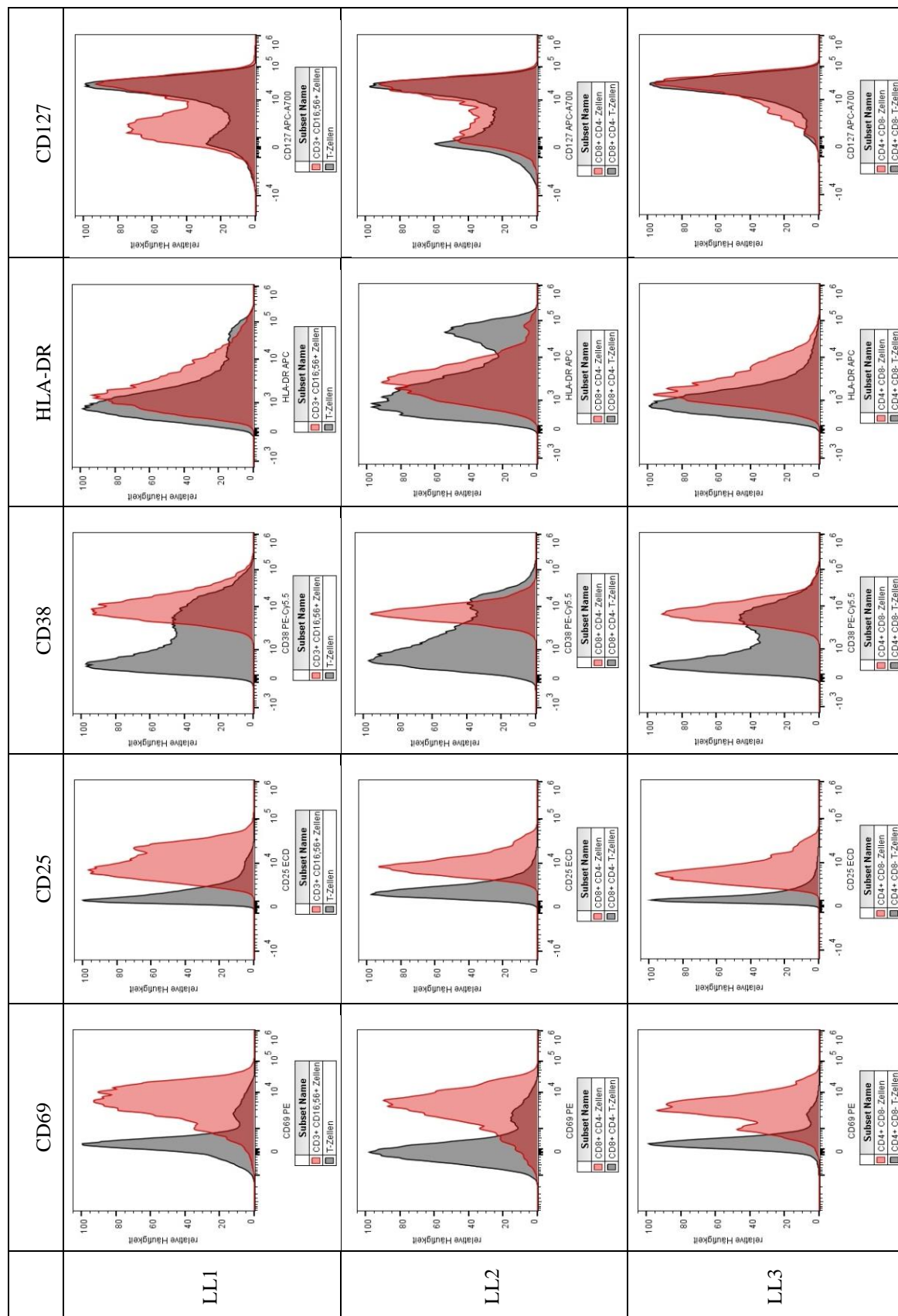


Abbildung 22: Darstellung eines Gatingergebnisses für ML. Es ist eine deutlich verringerte Anzahl an ML zu sehen, was die Abgrenzung der Gates erschwert.

Zur genaueren Untersuchung und Einordnung der gefundenen Subpopulationen wurde exemplarisch eine Analyse verschiedener Aktivierungsmarker durchgeführt und diese mit dem Expressionsmuster auf Lymphozyten und Monozyten, welche nach herkömmlicher Gatingstrategie analysiert wurden, verglichen (siehe Tabelle 21 und Abbildung 23). Das Gating der Monozyten ist in Abbildung 6 D, das der einzelnen Lymphozyten-subpopulationen in Abbildung 8 im Abschnitt 3.2.4 dargestellt. Die Darstellung der Expressionsmuster von Aktivierungsmarkern der LL in Tabelle 21 ist repräsentativ, die Untersuchung wurde für die Blutproben aller eingeschlossenen Probanden durchgeführt. Die Darstellung der Expressionsmuster von Aktivierungsmarkern der T-Zellen in Tabelle 21 ist exemplarisch und repräsentativ für 20 zufällig betrachtete Probanden durchgeführt wurden. Eine zukünftige Ausweitung dieser Vergleichsanalyse ist zu empfehlen.

Es wurde unter anderem das Oberflächenmolekül CD69 als sehr früher Aktivierungsmarker gewählt, welcher nicht nur bei aktivierten T-Zellen [73], sondern auch auf weiteren Leukozyten innerhalb kürzester Zeit nach Stimulation exprimiert wird [74]. Ihm wird eine immunmodulatorische, proinflammatorische Funktion zugesprochen [73]. Auch CD25 gilt allgemein als eher früher Marker für die Aktivierung von T-Lymphozyten [75]. Es repräsentiert die α -Einheit des Interleukin-2-Rezeptors und spielt damit eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion zum Beispiel zur Anregung der Proliferation. CD25 wird außerdem von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen exprimiert [76], welche eine immunsupprimierende Wirkung zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz aufweisen. Eine Unterscheidung der CD25⁺ Populationen ist anhand von CD127 (α -Einheit des Interleukin-7-Rezeptors) möglich, welches bei hochaktivierten T-Lymphozyten stark exprimiert wird und bei regulatorischen T-Zellen weniger [77]. Außerdem wurde die Analyse von CD38 durchgeführt, welcher unter anderem einen Aktivierungsmarker für T-Zellen darstellt. Als Oberflächenprotein auf Monozyten wirkt CD38 als Korezeptor für die Aktivierung und Stimulation von T-Lymphozyten [44]. Klinisch konnte CD38 zum Beispiel als prognostisch relevanter Parameter auf CD8⁺ Zellen bei HIV-Infizierten identifiziert werden [78]. HLA-DR gilt als später Aktivierungsmarker bei T-Lymphozyten und charakterisiert chronische und persistierende Infektionen sowie Autoimmunkrankheiten [75]. Er gehört zur Gruppe der MHC-Klasse II Moleküle, welche auf verschiedenen Antigen-präsentierenden Zellen, wie auch den Monozyten exprimiert werden. Bei diesen korreliert eine verminderte HLA-DR Expression mit einer Immundefizienz und kann damit als prognostischer Marker dienen [79].

Tabelle 21: Expressionsmuster ausgewählter Aktivierungsmarker auf den Populationen der Lymphozyten-ähnlichen Zellen (rot) sowie vergleichend auf den dazugehörigen T-Zellen im Lymphozytengate (schwarz) (Gating dieser siehe Abbildung 8 in 3.2.4).



Es ist in Tabelle 21 zu sehen, dass alle drei Lymphozyten-ähnlichen Populationen LL1, LL2 und LL3 im direkten Vergleich zu SS-H^{low} T-Zellen eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität von CD69, CD25 und CD38 aufweisen. Der Vergleich der Fluoreszenz von HLA-DR zeigt wiederum bei allen eine ähnliche Intensität. Daraus lässt sich vermuten, dass die neu beschriebenen Lymphozyten-ähnlichen Zellen hochaktiviert sind. Sie weisen eine hohe Expression von frühen Aktivierungsmarkern sowie eine geringere Dichte von späten Aktivierungsmarkern wie HLA-DR auf ihrer Oberfläche auf. Die Aktivierung müsste daher wenige Tage vor der Messung stattgefunden haben. Durch die Stimulation der Zellen könnte es zu einer Zunahme der intrazellulären Bestandteile und Vesikel kommen, welche eine Größenzunahme der Zellen bedingt. Mit Hilfe dieser Interpretation kann erklärt werden, dass die beschriebenen Populationen LL1, LL2 und LL3 hochaktivierte Lymphozyten sind, welche aufgrund einer Größenzunahme im SS-H CD45 Dotplot nach oben wandern und eine deutlich höhere Intensität des Seitwärtsstreulichts zeigen als bisher für Lymphozyten beschrieben wurde.

Außerdem ist in Tabelle 21 zu sehen, dass die LL1 zwei Peaks bezüglich der Expression von CD127 zeigen. Aufgrund der weiteren CD-Moleküle und der Literatur [77] lässt sich hinter den CD127^{high} Zellen eine hochaktivierte T-Lymphozytenpopulation erwarten. Die Population der CD127^{low} Zellen könnte eine besondere Untergruppe der regulatorischen T-Zellen, die CD3⁺ CD16/56⁺ NKT-Zellen (natürliche Killer T-Zellen) darstellen [80]. Da die NKT-Zellen auch einen Zusammenhang zu kardiovaskulären Erkrankungen aufweisen und in der Arteriosklerose eine Rolle spielen [81], sollten die hier beschriebenen Zellen nicht ignoriert werden. Durch ein SS-H^{low} typisches Gating der Lymphozyten werden diese Zellen jedoch bisher nicht erfasst. Dies sollte zukünftig in Bezug auf die Diagnostik überarbeitet werden.

In Abbildung 23 ist die Expression von CD69, CD38 und HLA-DR auf den Monozyten-ähnlichen Zellen vergleichend zu Monozyten (SS-H^{mid}) dargestellt. Die Analyse der Aktivierungsmarker auf den Monozyten-ähnlichen Zellen wurde für alle Probanden durchgeführt, die der Monozyten exemplarisch. Es ist zu sehen, dass die zwei verschiedenen Zellarten ein ähnliches Intensitätsmuster aufweisen, sich die ML also nicht von den Monozyten unterscheiden. Dies konnte für alle 20 exemplarischen Vergleiche gefunden werden. Es sollte erwähnt werden, dass die schwarz gekennzeichneten Monozyten nicht weiter klassifiziert wurden. Möglicherweise könnte sich durch eine weitere Differenzierung der Monozyten in klassische, intermediäre und nichtklassische und einen erneuten Vergleich ein anderes Ergebnis zeigen. Am ehesten würde man hier eine den intermediären Monozyten ähnliche Charakterisierung erwarten, da beide bezüglich der Phänotypen CD14 und CD16 positiv gategatet werden. Durch die genannte Einteilung der Monozyten konnte eine hohe klinische Relevanz der intermediären Zellen vor allem zu kardiovaskulären Erkrankungen gefunden werden [82–84]. Analog sollte durch eine

Differenzierung der Monozyten-ähnlichen Zellen eine mögliche Relevanz angenommen werden.

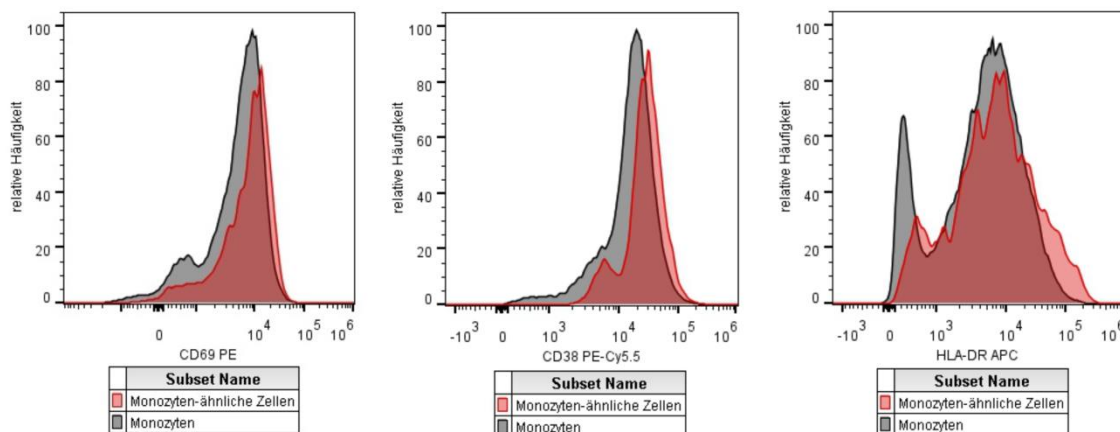


Abbildung 23: Expressionsmuster der Aktivierungsmarker CD69, CD38 und HLA-DR auf den Monozyten-ähnlichen Zellen (rot) sowie vergleichend auf den Monozyten (schwarz) (Gating siehe Abbildung 6 D).

5.2.2 Überblick und Diskussion der statistischen Analyse

Zur besseren Übersichtlichkeit der umfangreichen statistischen Analyse sind in Tabelle 22 alle Ergebnisse zusammengefasst sowie die signifikanten Resultate grau hervorgehoben. Bezüglich der stetigen Variablen Alter, WHR, HDL und LDL sollte kurz wiederholend die Bedeutung der Signifikanz erklärt werden. Für die jeweiligen Korrelationskoeffizienten wurde ein 95 % Konfidenzintervall betrachtet, dies bedeutet, der wahre Korrelationskoeffizient liegt mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 % innerhalb des errechneten Intervalls. Eine signifikante, lineare Korrelation (Signifikanzniveau 0,05) zwischen zwei untersuchten Parametern liegt dann vor, wenn die Null im 95 % Konfidenzintervall ausgeschlossen werden kann (grau unterlegte Werte). Der Wert des Korrelationskoeffizienten gibt dabei unabhängig von der Signifikanz die Stärke des Zusammenhangs an, wobei ein Wert von -1 einen vollständigen negativen und ein Wert von +1 einen vollständigen positiven linearen Zusammenhang beschreibt. Berechnete Werte, welche einen Betrag des Korrelationskoeffizienten größer als 0,1 aufweisen, wurden gesondert gekennzeichnet.

Da es in der Literatur noch keine Voruntersuchungen zu den hier analysierten Lymphozyten- und Monozyten-ähnlichen Zellen gibt, werden vergleichend Studiendaten von Lymphozyten und Monozyten herangezogen.

Tabelle 22: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse mit Angabe der berechneten p -Werte. Signifikante Ergebnisse sind grau unterlegt. (m) männlich (w) weiblich (n.s.) nicht signifikant (+) positive Korrelation (-) negative Korrelation (++) positive Korrelation, |Korrelationskoeffizient| > 0,1 (--) negative Korrelation, |Korrelationskoeffizient| > 0,1.

ML	w	< 0,0005	-	-	-	+	n.s.	n.s.	n.s.
	m		+	+	+	-	n.s.	n.s.	n.s.
N/LL3	w	n.s.	+	+	+	+	n.s.	n.s.	0,001
	m		-	+	-	+	n.s.	n.s.	n.s.
LL3	w	n.s.	-	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
	m		+	+	++	-	n.s.	n.s.	n.s.
N/LL2	w	n.s.	++	++	-	-	n.s.	n.s.	< 0,0001
	m		+	+	-	-	n.s.	n.s.	n.s.
LL2	w	n.s.	--	--	+	+	n.s.	n.s.	0,004
	m		-	+	+	-	0,007	n.s.	n.s.
LL1	w	n.s.	--	-	-	+	n.s.	n.s.	n.s.
	m		-	+	+	-	n.s.	n.s.	n.s.
		Geschlecht	Alter	WHR	HDL	LDL	Rauchstatus	Alkohol-konsum	Arterielle Hypertonie

Bezüglich des Geschlechts konnte bei den ML ein signifikanter Unterschied in der Zellzahl gefunden werden, wobei Frauen eine geringere Zellzahl zeigen. In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe [46] sowie in der Literatur [85] können Angaben zur Geschlechtsabhängigkeit von Monozyten gefunden werden. Hierbei wurde jeweils eine geringere Anzahl an Monozyten bei Frauen beschrieben. In Anlehnung an das Expressionsmuster der Aktivierungsmarker (siehe Abbildung 23) sowie die Geschlechtsabhängigkeit scheinen sich die ML nicht nur bezüglich der CD-Proteine wie die Monozyten zu verhalten. Bei den anderen Subpopulationen konnte kein Unterschied der Zellzahlen in Abhängigkeit vom Geschlecht gefunden werden. In der Literatur gibt es vergleichend

unterschiedliche Angaben zu Lymphozyten. In Vorarbeiten von Melzer *et al.* [46] wurde eine signifikant höhere Zellzahl von T-Helferzellen bei Frauen beschrieben. Diese T-Helferzellen sind $CD3^+ CD4^+ CD8^-$ und besitzen damit das gleiche Expressionsmuster wie die LL3 in dieser Arbeit. Der Unterschied besteht jedoch in einem früheren Gating-schritt, in dem die T-Helferzellen im Lymphozytenscatter ($SS-H^{low}$) untersucht werden. In der Literatur konnte in einigen europäischen Studien die Geschlechtsabhängigkeit der T-Helferzellen bestätigt werden [86]. Für die Untersuchung der LL3 in dieser Arbeit besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern (siehe Tabelle 8 in 4.1). Eine Assoziation zwischen Geschlecht und Granulozytenzahl ist in der Literatur kaum zu finden. Neben Untersuchungen, in denen die Unabhängigkeit der Zellzahl vom Geschlecht [46] beschrieben wurde, konnte in anderen Studien eine etwas höhere Eosinophilenzahl bei Männern [87] festgestellt werden. Mögliche Ursachen der verschiedenen Ergebnisse bezüglich der Geschlechtsabhängigkeit könnten die Unterschiede in der angewandten Methodik, der ethnischen Gruppen sowie der Anzahl an eingeschlossenen Probanden der jeweiligen Studie darstellen.

Weiterhin sollte auf den Einfluss des Alters auf Untersuchungen bezüglich der Geschlechtsabhängigkeit geachtet werden. Für die ML konnte keine signifikante Korrelation zwischen Alter und Zellzahl gefunden werden. Der Einfluss des Alters auf die gesamte Monozytenzahl wurde in Studien untersucht, wobei sich keine Abhängigkeit feststellen ließ [46; 85]. Jedoch konnte eine Korrelation der einzelnen Subpopulationen festgestellt werden [85]. Eine ähnliche Differenzierung der ML und Untersuchung der Subpopulationen ist daher anzustreben.

Unter den LL konnte bei zwei der drei Subpopulationen beim weiblichen Geschlecht eine negative Korrelation bezüglich des Alters festgestellt werden. In der Literatur ist analog ein Abfall der T-Lymphozyten sowie deren Subpopulationen mit zunehmendem Alter zu verzeichnen [46; 88]. Die stärkste Korrelation zeigt dabei LL2, welche mit den zytotoxischen T-Zellen ($SS-H^{low} CD3^+ CD8^+ CD4^-$) aus der Arbeit von Melzer *et al.* [46] verglichen werden können. Weiterhin konnte in Studien eine positive Alterskorrelation des Neutrophile/Lymphozyten Verhältnisses nachgewiesen werden [89], welches in dieser Arbeit für die LL2 ebenfalls gefunden wurde. Es wurde dennoch auf eine Aufteilung der Probanden in Altersgruppen für die weitere Analyse verzichtet. Gründe hierfür sind unter anderem eine Ungleichverteilung der Probandenanzahl in den jeweiligen Altersgruppen (siehe Abbildung 11 in 3.2.6), eine schwache Alterskorrelation ($|\text{Korrelationskoeffizient}| < 0,2$) sowie die nicht durchgeführte Anpassung der Konfidenzniveaus. Weiterhin sollte beachtet werden, dass die Daten, die für diese Arbeit herangezogen wurden, aus einer Querschnittsstudie stammen. Für die Bestätigung einer Alterskorrelation der Zellzahlen sollten die Daten in einer Längsschnittstudie erneut untersucht werden.

Bezüglich der WHR konnte für die LL2 eine signifikante negative Korrelation bei den weiblichen Probanden gefunden werden. Allgemein konnte mit ansteigender WHR der Trend einer abnehmenden Zellzahl der untersuchten Subpopulationen bei Frauen und einer zunehmenden Zellzahl bei Männern festgestellt werden. Bisherige Daten bezüglich der direkten Korrelationsanalyse von WHR und Zellzahlen sind relativ rar, da es verschiedene Möglichkeiten gibt, den Körperfettanteil zu charakterisieren. Häufig wird in Studien anstatt des WHR [90] der BMI [91; 92] oder auch der Taillenumfang [93] für Abhängigkeitsuntersuchungen herangezogen. In der Literatur wird ein positiver Zusammenhang zwischen Übergewicht und verschiedenen Zellzahlen wie WBC, Lymphozyten [91; 93; 92], Neutrophilen [93; 92; 90] und Monozyten [92] beschrieben. Auch für verschiedene Subtypen der Lymphozyten, zum Beispiel CD4⁺ wurden steigende Zellzahlen bei Übergewichtigen festgestellt [90; 92]. Eine negative Korrelation bezüglich des Zusammenhangs zwischen Neutrophile/Lymphozyten Verhältnis und BMI [91] konnte in dieser Arbeit bezüglich der WHR nicht bestätigt werden. Ein anscheinend abweichendes Verhalten von den Lymphozyten- und Monozyten-ähnlichen Zellen zu den bisher gängigen Leukozytensubpopulationen bezüglich der WHR-Abhängigkeit sollte in weiteren Arbeiten genauer untersucht werden. Hierbei sollte neben der Geschlechtsabhängigkeit auch auf die Altersabhängigkeit der WHR geachtet werden, welche in Studien nachgewiesen wurde [94]. Bei der Betrachtung der Ergebnisse in dieser Arbeit sollte das univariate Analyseverfahren bedacht werden. Die These, bei den LL handle es sich um hochaktivierte Lymphozyten, kann jedoch mit diesen Ergebnissen gestützt werden, da die Aktivierung des Immunsystems durch Übergewicht eine chronische und nicht akute Entzündungsreaktion [95] bewirkt und damit vermutlich zu keiner Erhöhung der Zellzahl der in dieser Arbeit untersuchten Subpopulationen führt.

In der Untersuchung zur Abhängigkeit der Zellzahlen von den Cholesterolwerten HDL und LDL konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden. In bisherigen Studien wurde ein geringerer HDL bei erhöhtem WBC beschrieben [96]. Hierbei ist jedoch die Kausalkette unklar. Besteht eine direkte gegenseitige Beeinflussung oder besteht eine Koabhängigkeit in Zusammenhang zum Übergewicht, da dieses für sich ein niedriges HDL und einen erhöhten WBC bedingt? Aufgrund der möglichen Korrelation wurden zusätzliche Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen WHR und HDL bzw. WHR und LDL durchgeführt (siehe Tabelle 23 und Abbildung 33 im Anhang). In der hier untersuchten Kohorte konnte jedoch keine signifikante Korrelation dieser Merkmale gefunden werden. Die Untersuchung eines Zusammenhangs kann in einer multivariaten Analyse wiederholt werden. Obwohl in Studien HDL und LDL keine signifikante Geschlechts- oder Altersabhängigkeit aufweist [97], sollte zukünftig eine getrennte Analyse für Geschlecht und verschiedene Altersgruppen durchgeführt werden, da eine mögliche Abhängigkeit der Zellzahlen zu diesen biometrischen Daten besteht

(siehe Subpopulation LL2). Dies erfordert unter anderem eine sehr hohe Fallzahl und Gleichverteilung der Datensätze in den jeweiligen Altersgruppen.

Der Lebensstil ist einer der wichtigsten Faktoren, die zum kardiovaskulären Risikoprofil beisteuern. Er umfasst dabei vor allem die Ernährung, den Rauchstatus, den Alkoholkonsum sowie körperliche Betätigung. Der Einfluss des Rauchens auf die Pathogenese und die Progression der Arteriosklerose ist bereits zahlreich untersucht und bestätigt worden [98–100]. Hierbei spielen vor allem die Endothelschädigung durch vermehrte Erythrozyten- und Thrombozytenaggregation mit Fibrinogenerhöhung und die veränderte Blutviskosität mit erhöhter Entzündungsreaktion eine Rolle. Der Zusammenhang des Rauchstatus mit Markern des Immunsystems wurde bereits in Vorarbeiten untersucht. Hierbei konnte ein erhöhter WBC bei gegenwärtigen Rauchern gegenüber ehemaligen Rauchern [17; 101] sowie Nichtrauchern festgestellt werden [101; 102]. Auch bei Untersuchungen von Lymphozytensubpopulationen wurden erhöhte Zellzahlen an $CD8^+$ T-Zellen bei gegenwärtigen Rauchern (Nikotinkonsum mindestens 10 Jahre) beschrieben [103]. Dies ist besonders für die Ergebnisse dieser Arbeit relevant, da eine signifikant höhere Zellzahl der LL2 ($CD8^+ CD4^-$) bei männlichen Rauchern gefunden wurde (siehe Tabelle 14, Abbildung 19 in 4.5.1). Es lässt sich daher vermuten, dass durch den Rauchkonsum eine akute Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen stattfindet, welche dann im Granulozytenscatter als vergrößerte und stark granulierte Zellen imponieren (entspricht LL2). Auffällig ist, dass zwar ein signifikanter Unterschied zwischen ehemaligen Rauchern und gegenwärtigen Rauchern ($p = 0,002$) gefunden wurde, jedoch nicht zwischen Nichtrauchern und gegenwärtigen Rauchern ($p = 0,023$). Bei der Beurteilung dieses Ergebnisses sollte ein p -Wert von 0,023 zumindest als Trend betrachtet und eine mögliche Fehlerbetrachtung hinzugezogen werden. Es besteht die Möglichkeit einer Unterschiedlichkeit bezüglich anderer, nicht erfasster Parameter in den jeweiligen Gruppen. Hierbei sollte in zukünftigen Studien gesondert auf eine Koabhängigkeit geachtet werden. Bezüglich des Rauchstatus haben 9,6 % der Probanden keine Angaben gemacht, wurden daher keiner Gruppe zugeordnet. Aufgrund des Fehlens der Angaben ist die Fallzahl bei der Untersuchung des Rauchstatus vermindert, was eine erhöhte Fehleranfälligkeit nach sich zieht. Weiterhin ist eine deutliche Ungleichverteilung innerhalb der Gruppen zu verzeichnen. Besonders bei den Frauen ist die Zahl der aktuellen Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern sehr gering (siehe Tabelle 13 in 4.5.1). Eine erneute Untersuchung der Hypothese, es bestehe kein Zusammenhang zwischen der Zellzahl der LL2 und dem Rauchstatus ist daher zu empfehlen.

Die Umkehrbarkeit des Nikotineffektes auf das Immunsystem, welche schon in mehreren Studien beschrieben wurde [101; 103; 104], kann auch in dieser Arbeit für die LL2 bestätigt werden, da kein signifikanter Unterschied zwischen den ehemaligen Rauchern und Nichtrauchern sowie ein signifikanter Unterschied zwischen gegenwärtigen Nicht-

rauchern und gegenwärtigen Rauchern ($p = 0,003$; siehe Tabelle 15, Abbildung 19 in 4.5.1) gefunden wurde.

Der Einfluss des Alkoholkonsums ist komplex und trotz zahlreicher Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen moderatem Alkoholkonsum und einem geringeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen gefunden wurde, umstritten. Ein besonders hoher Alkoholkonsum ist jedoch eher mit einem erhöhten Risiko für Arteriosklerose verbunden [105]. Das Interesse an einer möglichen Einflussnahme auf Zellzahlen und vor allem inflammatorische Marker ist aufgrund deren Zusammenhangs zu kardiovaskulären Ereignissen hoch. In Studien konnte ein J- beziehungsweise U-förmiger Zusammenhang zwischen Alkoholaufnahme und WBC bzw. CRP gefunden werden [106; 107; 17]. Dies bedeutet, der geringste WBC- bzw. CRP-Wert liegt bei einem moderaten Alkoholkonsum. Bei geringerem bzw. höherem Konsum steigt der WBC- bzw. CRP-Wert an. Trägt man dies in ein Diagramm ein (WBC oder CRP zu Alkoholkonsum), so erhält man eine J- bzw. U-förmige Kurve. Der antiinflammatorische Einfluss des moderaten Alkoholkonsums bestätigt den positiven Effekt in Bezug auf ein niedrigeres kardiovaskuläres Risiko. In Untersuchungen von Lymphozytensubpopulationen wurden mit erhöhtem Alkoholkonsum geringere Zellzahlen von $CD8^+$ T-Zellen [108] sowie erhöhte Zellzahlen an $CD4^+$ [108] und $CD3^+$ T-Zellen bei Frauen [109] gefunden. Ein signifikanter Unterschied in der Zellzahl der in dieser Arbeit untersuchten Subpopulationen in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum konnte nicht gefunden werden. Dies spricht für die Annahme, es handele sich bei den Subpopulationen um hochaktivierte Zellen, da langbestehender hoher Alkoholkonsum eher zur chronischen Entzündungsreaktion mit erhöhten Monozyten und dendritischen Zellen führt [110] und nicht akuter inflammatorischer Zellen. Hierbei sollte jedoch die rein anamnestische Datenerhebung bedacht werden. 82,6 % der 869 eingeschlossenen Probanden machten Angaben bezüglich ihres Alkoholkonsums. Eine mögliche fehlerhaft geringere Angabe beziehungsweise eine bewusste Nichtangabe erhöhten Alkoholkonsums aufgrund von Stigmatisierung sollten als mögliche Fehlerquellen der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

Bei der Untersuchung der Frage, ob die in dieser Arbeit untersuchten Subpopulationen als Biomarker für kardiovaskuläre Ereignisse herangezogen werden können, wurde das Vorhandensein eines arteriellen Hypertonus als wichtiges Merkmal des metabolisch-vaskulären Syndroms [10] erfragt und dessen Zusammenhang zu den Zellzahlen untersucht. Aufgrund der reduzierten Fallzahlen bezüglich dieses Merkmals wurde eine grobe Prüfung der Altersverteilung der 645 Probanden mit den insgesamt eingeschlossenen 869 Probanden durchgeführt (siehe Abbildung 34 im Anhang). Dabei kann von einer repräsentativen Stichprobe bezüglich des Alters der Probanden ausgegangen werden. Es konnte eine signifikante Erhöhung der Zellzahl der LL2 bei den Probanden ohne Bluthochdruck gegenüber den bekannten Hypertonikern ($p = 0,004$) festgestellt werden. Weiterhin ergibt sich ein signifikant geringeres Neutrophile/LL2 Verhältnis bei Nicht-

hypertonikern gegenüber den bekannten Hypertonikern ($p < 0,0001$). Gleiches konnte für das Neutrophile/LL3 Verhältnis gefunden werden ($p = 0,001$) (siehe Tabelle 20, Abbildung 21 in 4.6). In der Literatur konnte gegenteiliges für die Leukozytenzahl gefunden werden. In Studien wurde ein signifikant erhöhter systolischer beziehungsweise diastolischer Blutdruck bei erhöhtem WBC festgestellt [17; 96; 101]. Dieser Zusammenhang konnte auch bei erhöhten Neutrophilen und Lymphozyten gefunden werden [96]. Analog wurde in Vorarbeiten ein erhöhtes Neutrophile/Lymphozyten Verhältnis bei Hypertonikern [111] festgestellt. Die gegenteiligen Ergebnisse dieser Arbeit könnten hier wieder auf die verschiedenen Subpopulationen zurückgeführt werden. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass besonders die LL2 aufgrund der negativen Korrelation in der Zukunft als mögliche Biomarker für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko eingesetzt werden können.

Hypertonie ist eine chronische kardiovaskuläre Erkrankung, die mit einer chronischen Aktivierung des Immunsystems einhergehen kann. Von einem aktivierenden Effekt auf akute Entzündungsmarker, worum es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Subpopulationen am ehesten handelt, ist nicht auszugehen. Weiterhin sollte auch hier eine Fehlerbetrachtung stattfinden. Es besteht eine deutliche Ungleichverteilung über die einzelnen Gruppen des Merkmals arterielle Hypertonie (siehe Tabelle 18 in 4.6). Weiterhin könnten die Merkmalsausprägungen überdacht werden. Die Merkmalsausprägung „bekannte Hypertonie“ ist eine sehr heterogene Gruppe. Hier könnten medikamentös gut Eingestellte von Resistenten und nicht Anbehandelten unterschieden werden, da hier in Anbetracht von Vorarbeiten ein Einfluss auf die Zellzahl zu vermuten wäre [111]. Außerdem könnten mit Hilfe von Mehrfachmessungen Probanden der Gruppe „hypertoner Messwert ohne vorherige Blutdruckdiagnose“ je nach Messwerten einer der beiden anderen Gruppen zugeteilt werden.

6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine erste Beschreibung von Lymphozyten- und Monozyten-ähnlichen Zellen im Granulozytenscatter vorgenommen sowie Korrelationen zu biometrischen und lebensstilrelevanten Merkmalen untersucht. Wegen der möglichen Assoziation zu kardiovaskulären Erkrankungen ist auf der Grundlage der entwickelten Gatingstrategie (siehe Abbildung 6, Abbildung 7 in 3.2.4) eine weitere Untersuchung der Phänotypisierung sowie vor allem der biologischen Funktion und Aufgabe dieser Subpopulationen zu erwarten. Hierbei kann unter anderem die Untersuchung und Auswertung der exemplarisch dargestellten Analyse der Aktivierungsmarker (siehe Tabelle 21, Abbildung 23 in 5.2.1) fortgeführt werden. Mittels FACS (engl. *Fluorescence-activated cell sorting*) könnte man die einzelnen hier beschriebenen Subpopulationen mit Hilfe der angegebenen Phänotypen sortieren und im Folgenden stimulieren, um eine mögliche funktionelle Testung durchzuführen.

Außerdem können mit Hilfe der Aktivierungsmarker oder anderer spezifischer Oberflächenproteine nicht nur Marker zur Diagnostik, sondern auch mögliche therapeutische Angriffspunkte für assoziierte Erkrankungen gefunden werden, wie beispielsweise bereits monoklonale CD69-Antikörper zur Asthmabehandlung [112]. Zur besseren Vergleichbarkeit zukünftiger Untersuchungen sollte die Erstellung eines automatischen Gatings auf Grundlage der hier vorgestellten manuellen Gatingstrategie in Betracht gezogen werden, da diese u.a. den Vorteil der objektiven Analyse bietet [68; 69].

Eine weitere Untersuchung der Funktion der Subpopulationen und deren Einfluss auf kardiovaskuläre Risikofaktoren und Erkrankungen sind vor allem aufgrund des gefundenen Zusammenhangs mit arteriellem Hypertonus (siehe Tabelle 20, Abbildung 21 in 4.6) sinnvoll. Besonders auch wegen des gegenteiligen Verhaltens der untersuchten Subpopulationen zu bisherig untersuchten Leukozyten bezüglich des Zusammenhangs zwischen Zellzahl und arterieller Hypertonie ist die biologische Funktion für weitere Arbeiten von Interesse [17; 96; 101]. Hierbei sollte neben den in dieser Arbeit untersuchten Merkmalen auch die für das metabolisch-vaskuläre Syndrom wichtige Insulinresistenz analysiert werden [10]. In zukünftigen Studien kann für die Merkmalsanalyse die Methodik der multivariaten Analyse angewendet werden, um Koabhängigkeiten wie die Altersabhängigkeit der WHR [94] zu berücksichtigen. Bezüglich der WHR kann in diesem Zusammenhang auch dem gegenläufigen Effekt der Zellanzahl bei ansteigender WHR zwischen den einzelnen Geschlechtern nachgegangen werden.

Neben der Untersuchung der Subpopulationen auf einen möglichen Zusammenhang zu kardiovaskulären Erkrankungen sollten weiterführende Analysen auch immunologische

und entzündliche Erkrankungen berücksichtigen, da die LL vermutlich hochaktivierte Lymphozyten sind (siehe Tabelle 21 in 5.2.1).

Im Mittelpunkt weiterer Arbeiten könnten die LL2 stehen, da diese besonders viele signifikante Zusammenhänge zeigen (siehe Tabelle 22 in 5.2.2). Eine Verbesserung der Aussagekraft kann durch die Kontrolle der einzelnen Merkmale und Parameter im Verlauf erzielt werden. Dies ist aufgrund der Fortführung der LIFE-Studie mit einem longitudinalen Studiendesign möglich. Bei bestätigtem Zusammenhang zu kardiovaskulären Erkrankungen sollte besonders diese gefundene Subpopulation als möglicher Biomarker gesehen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Fortführung dieser Arbeit besteht in der genaueren Analyse der Monozyten-ähnlichen Zellen. Wie bereits erwähnt, zeigen Monozyten erst durch eine weitere Differenzierung in klassische, intermediäre und nichtklassische Monozyten eine Korrelation bezüglich biometrischer Merkmale, wobei die intermediären Zellen einen prognostischen Wert für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen [82; 85]. Eine mögliche Änderung der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bezüglich der ML könnte durch die Unterteilung in diese Gruppen auftreten, was eine Relevanz der ML für zukünftige Diagnostik und eventuell auch Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen bedeuten könnte.

7 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Gating neuer Subpopulationen im Granulozytenscatter mit Leukozyten-ähnlichem Phänotyp und deren Zusammenhang zu kardiovaskulären Risikofaktoren

eingereicht von Marlene Kautzner

angefertigt im Herzzentrum Leipzig GmbH, Forschung und Lehre, Kinderkardiologie

betreut von: Prof. Dr. Attila Tárnok, Prof. Dr. Markus Löffler

Februar 2018

Neutrophile Granulozyten bilden den Hauptanteil der im menschlichen Körper befindlichen Leukozyten und sind damit einer der wichtigsten Bestandteile unseres angeborenen Immunsystems. Die Funktion dieser Zellen besteht hauptsächlich in der durch Phagozytose sofortigen Antwort auf Infektionserreger sowie der Entzündungsreaktion auf Stress. Dies spielt eine wesentliche Rolle in der Entstehung der Arteriosklerose und damit in der Pathogenese für kardiovaskuläre Erkrankungen, welche zu den führenden Todesursachen in Deutschland gehören. Mögliche inflammatorische, zelluläre Biomarker wie die Gesamtzahl an weißen Blutkörperchen und das Neutrophile/Lymphozyten Verhältnis zur Diagnostik dieser Erkrankungen wurden in vorherigen Studien gefunden und verstärken das Interesse an Entzündungszellen als prognostischen Faktor. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Granulozyten aufgrund ihrer Größe und Granularität im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht identifiziert werden. In der Arbeitsgruppe um Prof. Tárnok wurden jedoch in dem besagten Scatter neben den Granulozyten auch Zellen gefunden, welche auf ihrer Oberfläche typische CD-Proteine für andere Leukozytensubpopulationen tragen.

Inhalt dieser Arbeit ist die Analyse und Charakterisierung der bisher nicht beschriebenen Subpopulationen, die Entwicklung einer Gatingstrategie sowie die Untersuchung der Abhängigkeit der Zellzahlen von biometrischen Merkmalen (Geschlecht, Alter), Lebensstildaten (Alkoholkonsum, Rauchstatus) und Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (WHR, HDL, LDL). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Korrelationsanalysen, sowie der Anwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests und Kruskal-Wallis-Tests.

Hierfür wurden 864 Probanden der LIFE-Adult Kohorte der Leipziger LIFE-Studie, welche eine geschlechts- und altersstratifizierte prospektive, longitudinale Kohortenstudie des Leipziger Forschungszentrums für Zivilisationskrankheiten ist, eingeschlossen. Die Datenerhebung fand vom Februar 2011 bis August 2014 statt. Zur Analyse der Subpopulationen in den Erythrozyten-lysierten Blutproben wurde ein speziell angefertigtes Protokoll, das OMIP-023 (engl. *Optimized Multicolor Immunofluorescence Panel*) eingesetzt, welches aus 13 verschiedenen monoklonalen Antikörpern besteht. Mittels Auswertung durch manuelles Gating mit der Software FlowJo V.10.0.7 konnten drei verschiedene Subpopulationen von Lymphozyten-ähnlichen Zellen (LL1: CD3⁺, CD16/56⁺, CD45⁺, SS-H^{mid-high}; LL2: CD3⁺, CD38^{low}, CD8⁺, CD4⁻, CD16/56⁺, CD45⁺, SS-H^{mid-high}; LL3: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻, CD16/56⁺, CD45⁺, SS-H^{mid-high}) sowie Monozyten-ähnliche Zellen (ML: CD3⁻, CD38⁺, CD14⁺, CD4⁻, CD16⁺, CD45⁺, SS-H^{mid-high}) charakterisiert werden (entwickelte Gatingstrategie siehe Abbildung 24).

Aufgrund einer starken Expression von frühen Aktivierungsmarkern wie CD69 und CD25 kann bei den LL von hoch aktivierten Lymphozyten ausgegangen werden, welche aufgrund der Ansammlung von intrazellulären Vesikeln an Größe und Granularität zunehmen und daher im Granulozytenscatter auftauchen.

Für die LL1 und die LL2 der weiblichen Probanden konnte eine negative Korrelation bezüglich des Alters festgestellt werden. In der Literatur sind analog Studien zu finden, in denen eine Abnahme der T-Lymphozyten (CD3⁺, SS-H^{low}) im Alter beschrieben wurde, was für die Entität der LL als Lymphozyten spricht. Weiterhin konnte eine Abhängigkeit der LL2 der weiblichen Probanden von der WHR beschrieben werden, wobei die Zellzahl mit zunehmender WHR abnimmt. In Voruntersuchungen ist bezüglich der Lymphozytenzahlen eine positive Korrelation mit Adipositas beschrieben. Aufgrund dieser gegensätzlichen Verhaltensweise der LL2 ist eine weiterführende Untersuchung dieser Zellen anzuraten. Erwartungsgemäß konnte in dieser Arbeit eine Abhängigkeit der Zellzahlen vom Rauchstatus nachgewiesen werden. Studien, welche eine Aktivierung des Immunsystems mit steigenden Entzündungsmarkern nachweisen, sind in der Literatur zahlreich zu finden. Bezüglich der LL2 der männlichen Probanden besteht eine signifikant höhere Zellzahl bei gegenwärtigen Rauchern gegenüber ehemaligen Rauchern ($p = 0,002$) sowie gegenwärtigen Nichtrauchern ($p = 0,003$). Dies bestätigt die Umkehrbarkeit des Nikotineffektes auf das Immunsystem, welche schon in mehreren

Studien beschrieben wurde. Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Zellzahl und arteriellem Hypertonus konnte erneut ein signifikantes Ergebnis der LL2 bei weiblichen Probanden verzeichnet werden. Bekannte Hypertoniker besitzen eine geringere Anzahl der LL2 gegenüber Probanden ohne Bluthochdruck ($p = 0,004$). Weiterhin wurde ein signifikant geringeres Neutrophile/LL2 ($p < 0,0001$) und Neutrophile/LL3 ($p = 0,001$) Verhältnis der weiblichen Nicht-Hypertoniker gegenüber der Hypertoniker gefunden.

Zusammenfassend lässt sich behaupten, die LL2 haben das Potential in der Zukunft als möglicher Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen eingesetzt zu werden. Hierbei wurde in dieser Arbeit eine geringere Anzahl an LL2 bei höherem Lebensalter, einer erhöhten WHR, sowie bei Vorliegen eines arteriellen Hypertonus gefunden, was ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko darstellt.

Bezüglich der Monozyten-ähnlichen Zellen wurde eine signifikant höhere Zellzahl bei den männlichen Probanden gefunden ($p < 0,0005$). Aufgrund der hohen Relevanz von Monozytensubpopulationen zu kardiovaskulären Erkrankungen sind weiterführende Studien bezüglich der ML zu erwarten. Hierbei kann analog zu Monozyten eine Erweiterung der Gatingstrategie zur Einteilung der ML in klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten-ähnliche Zellen empfohlen werden, um mögliche Korrelationen zu weiteren biometrischen Merkmalen und kardiovaskulären Risikofaktoren zu untersuchen.

Mit Hilfe der erstmaligen Beschreibung, Charakterisierung und Abhängigkeitsanalyse der Leukozyten-ähnlichen Zellen im Granulozytenscatter in dieser Arbeit konnte die Grundlage für weitere morphologische und funktionelle Untersuchungen für diese Subpopulationen gelegt werden. Die Notwendigkeit dieser wird durch die bereits beschriebenen Zusammenhänge zu biometrischen und lebensstilassozierten Merkmalen sowie die mögliche Relevanz zu kardiovaskulären oder inflammatorischen Erkrankungen deutlich.

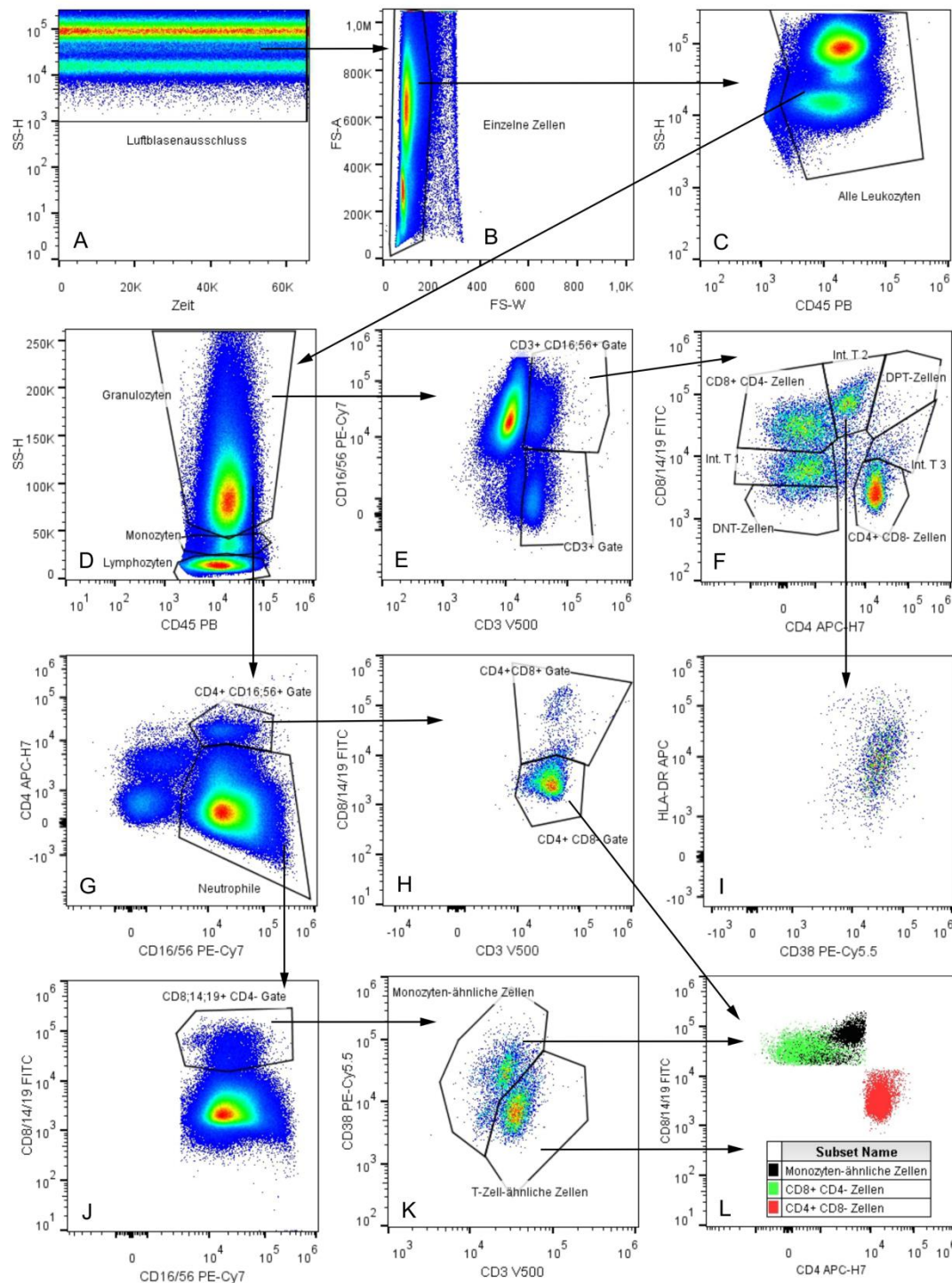


Abbildung 24: Gatingschema für Granulozyten Subpopulationen. (A) Luftblasenausschluss (B) Doublettenausschluss (C) Ausschluss CD45⁻ Ereignisse (D) Differenzierung von Lymphozyten mit basophilen Granulozyten, Monozyten und Neutrophilen mit eosinophilen Granulozyten (E) Gating von CD3⁺ CD16/56⁺ Ereignissen, LL1 (F) erweitertes T-Zell-Gating (I) Gating der Int. T2 Ereignisse auf CD38 und HLA-DR als Hinweis auf monozytäre Verunreinigung (G) Differenzierung der CD16/56⁺ Ereignisse bezüglich CD4 (H) Untersuchung der CD16/56⁺ CD4⁺ auf CD8 (J) Gating von CD8/14/19⁺ Ereignissen unter den CD16/56⁺ CD4⁻ (K) mit weiterer Differenzierung in ML und LL2 (L) Backgating von ML, LL2 und LL3 zur Lagedarstellung der Ereignisse verglichen mit (F).

8 Literaturverzeichnis

- [1] Schultze MJ.: Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. Arch Mikrosk Anat. 1865.
- [2] Ehrlich, P.; Lazarus, A.: Histology of the Blood; Normal and Pathological. Cambridge University Press. 1900.
- [3] Ganten, Detlev; Bartram, Claus R.; Aguzzi, Adriano: Immunsystem und Infektologie. Springer. 1999.
- [4] Lloyd, A. R.; Oppenheim, J. J.: Poly's lament. Immunology Today. 1992.
- [5] Kovalszki, A.; Weller, P. F.: Eosinophilia. Primary care. 2016.
- [6] Pehlivanoglu, B.; Doganavsargil, B.; Sezak, M.; Nalbantoglu, I.; Korkmaz, M.: Gastrointestinal Parasitosis: Histopathological Insights to Rare but Intriguing Lesions of the Gastrointestinal Tract. Turk patoloji dergisi. 2016.
- [7] Ebo, D. G.; Hagendorens, M. M.; Bridts, C. H.; Schuerwegh, A. J.; Clerck, L. S. de; Stevens, W. J.: In vitro allergy diagnosis. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 2004.
- [8] Clark, G.; Stockinger, H.; Balderas, R.; van Zelm, M. C.; Zola, H.; Hart, D.; Engel, P.: Nomenclature of CD molecules from the Tenth Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop. Clinical & translational immunology. 2016.
- [9] Statistisches Bundesamt (Destatis): Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2015.
- [10] Scholz, G. H.; Hanefeld, M.: Metabolic Vascular Syndrome. Visceral medicine. 2016.
- [11] Naruko, T.; Ueda, M.; Haze, K.; van der Wal, A. C.; van der Loos, C. M.; Itoh, A.; Komatsu, R.; Ikura, Y.; Ogami, M.; Shimada, Y., *et al.* Becker, A. E.: Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. Circulation. 2002.
- [12] Kling, D.; Holzschuh, T.; Betz, E.: Temporal sequence of morphological alterations in artery walls during experimental atherogenesis--occurrence of leukocytes. Research in experimental medicine. Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie. 1987.
- [13] Buckley, D. I.; Fu, R.; Freeman, M.; Rogers, K.; Helfand, M.: C-Reactive Protein as a Risk Factor for Coronary Heart Disease. Annals of Internal Medicine. 2009.
- [14] Danesh, J.; Erqou, S.; Walker, M.; Thompson, S. G.; Tipping, R.; Ford, C.; Pessell, S.; Walldius, G.; Jungner, I.; Folsom, A. R., *et al.* Wood, A. M.: The Emerging Risk Factors Collaboration. European journal of epidemiology. 2007.

- [15] Ensrud, K.; Grimm, R. H., JR: The white blood cell count and risk for coronary heart disease. *American heart journal*. 1992.
- [16] Stoner, L.; Lucero, A. A.; Palmer, B. R.; Jones, L. M.; Young, J. M.; Faulkner, J.: Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Clinical biochemistry*. 2013.
- [17] Odagiri, K.; Uehara, A.; Mizuta, I.; Yamamoto, M.; Kurata, C.: Longitudinal study on white blood cell count and the incidence of metabolic syndrome. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2011.
- [18] Amrock, S. M.; Weitzman, M.: Multiple biomarkers for mortality prediction in peripheral arterial disease. *Vascular medicine (London, England)*. 2016.
- [19] Horne, B. D.; Anderson, J. L.; John, J. M.; Weaver, A.; Bair, T. L.; Jensen, K. R.; Renlund, D. G.; Muhlestein, J. B.: Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *Journal of the American College of Cardiology*. 2005.
- [20] Sharma, K. H.; Shah, K. H.; Patel, I.; Patel, A. K.; Chaudhari, S.: Do circulating blood cell types correlate with modifiable risk factors and outcomes in patients with acute coronary syndrome (ACS)? *Indian heart journal*. 2015.
- [21] Verdoia, M.; Barbieri, L.; Di Giovine, G.; Marino, P.; Suryapranata, H.; Luca, G. de: Neutrophil to Lymphocyte Ratio and the Extent of Coronary Artery Disease: Results From a Large Cohort Study. *Angiology*. 2016.
- [22] Bonner, W. A.; Hulett, H. R.; Sweet, R. G.; Herzenberg, L. A.: Fluorescence Activated Cell Sorting. *Review of Scientific Instruments*. 1972.
- [23] Abraham, R. S.; Aubert, G.: Flow Cytometry: A Versatile Tool For Diagnosis And Monitoring Of Primary Immunodeficiencies (PIDs). *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2016.
- [24] Schmitz, Gerd; Rothe, Gregor: Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schattauer. 1994.
- [25] Loken, M. R.; Sweet, R. G.; Herzenberg, L. A.: Cell discrimination by multiangle light scattering. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1976.
- [26] Salzman, G. C.; Crowell, J. M.; Martin, J. C.; Trujillo, T. T.; Romero, A.; Mul-laney, P. F.; LaBauve, P. M.: Cell classification by laser light scattering. *Acta cytologica*. 1975.
- [27] Sack, U.: Zelluläre Diagnostik. S. Karger. 2007.

- [28] Ruhle, P. F.; Fietkau, R.; Gaipf, U. S.; Frey, B.: Development of a Modular Assay for Detailed Immunophenotyping of Peripheral Human Whole Blood Samples by Multicolor Flow Cytometry. *International journal of molecular sciences*. 2016.
- [29] Szaloki, G.; Goda, K.: Compensation in multicolor flow cytometry. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2015.
- [30] Pockley, A. G.; Foulds, G. A.; Oughton, J. A.; Kerkvliet, N. I.; Multhoff, G.: Immune Cell Phenotyping Using Flow Cytometry. *Current protocols in toxicology*. 2015.
- [31] Nguyen, R.; Perfetto, S.; Mahnke, Y. D.; Chattopadhyay, P.; Roederer, M.: Quantifying spillover spreading for comparing instrument performance and aiding in multicolor panel design. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2013.
- [32] Roederer, M.: Compensation in flow cytometry. *Current protocols in cytometry*. 2002.
- [33] Fluorescence SpectraViewer. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>. Zuletzt geprüft am 05.08.2017.
- [34] Sack, Ulrich: *Zelluläre Diagnostik und Therapie*. De Gruyter. 2016.
- [35] Cols, M.; Rahman, A.; Maglione, P. J.; Garcia-Carmona, Y.; Simchoni, N.; Ko, H.-B. M.; Radigan, L.; Cerutti, A.; Blankenship, D.; Pascual, V., *et al.* Cunningham-Rundles, C.: Expansion of inflammatory innate lymphoid cells in patients with common variable immune deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016.
- [36] Vries, E. de; Noordzij, J. G.; Kuijpers, T. W.; van Dongen, J. J.: Flow cytometric immunophenotyping in the diagnosis and follow-up of immunodeficient children. *European journal of pediatrics*. 2001.
- [37] Khan, T. A.; Kalsoom, K.; Iqbal, A.; Asif, H.; Rahman, H.; Farooq, S. O.; Naveed, H.; Nasir, U.; Amin, M. U.; Hussain, M., *et al.* Florea, A.: A novel missense mutation in the NADPH binding domain of CYBB abolishes the NADPH oxidase activity in a male patient with increased susceptibility to infections. *Microbial pathogenesis*. 2016.
- [38] Cauli, A.; Dessole, G.; Fiorillo, M. T.; Vacca, A.; Mameli, A.; Bitti, P.; Passiu, G.; Sorrentino, R.; Mathieu, A.: Increased level of HLA-B27 expression in ankylosing spondylitis patients compared with healthy HLA-B27-positive subjects. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2002.

- [39] Kestens, L.; Mandy, F.: Thirty-five years of CD4 T-Cell counting in HIV infection. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*. 2016.
- [40] Dalmazzo, L. F. F.; Jacomo, R. H.; Marinato, A. F.; Figueiredo-Pontes, L. L.; Cunha, R. L. G.; Garcia, A. B.; Rego, E. M.; Falcao, R. P.: The presence of CD56/CD16 in T-cell acute lymphoblastic leukaemia correlates with the expression of cytotoxic molecules and is associated with worse response to treatment. *British journal of haematology*. 2009.
- [41] Rawstron, A. C.; Fazi, C.; Agathangelidis, A.; Villamor, N.; Letestu, R.; Nomdedeu, J.; Palacio, C.; Stehlikova, O.; Kreuzer, K.-A.; Liptrot, S., *et al.* Ghia, P.: A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2016.
- [42] Loeffler, M.; Engel, C.; Ahnert, P.; Alfermann, D.; Arelin, K.; Baber, R.; Beutner, F.; Binder, H.; Brähler, E.; Burkhardt, R., *et al.* Thiery, J.: The LIFE-Adult-Study: objectives and design of a population-based cohort study with 10,000 deeply phenotyped adults in Germany. *BMC public health*. 2015.
- [43] Bocsi, J.; Melzer, S.; Dähnert, I.; Tárnok, A.: OMIP-023: 10-color, 13 antibody panel for in-depth phenotyping of human peripheral blood leukocytes. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2014.
- [44] Zilber, M. T.; Gregory, S.; Mallone, R.; Deaglio, S.; Malavasi, F.; Charron, D.; Gelin, C.: CD38 expressed on human monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000.
- [45] Waist circumference and waist-hip ratio. World Health Organization. 2011.
- [46] Melzer, S.; Zachariae, S.; Bocsi, J.; Engel, C.; Löffler, M.; Tárnok, A.: Reference intervals for leukocyte subsets in adults: Results from a population-based study using 10-color flow cytometry. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*. 2015.
- [47] O. Brosteanu, C. Engel, J. Forberg, G. Gelbrich, D. Hasenclever, B. Hentschel, M. Löffler, I. Röder, E. Schuster, B. Wicklein, M. Ziepert: *Methodensammlung zur Auswertung klinischer und epidemiologischer Daten*. 2008.
- [48] Sedgwick, P.: Multiple significance tests. *BMJ*. 2012.
- [49] Mikrozensus - Fragen zur Gesundheit. <http://www.gbe-bund.de>.
- [50] Dagenais, G. R.; Yi, Q.; Mann, J. F. E.; Bosch, J.; Pogue, J.; Yusuf, S.: Prognostic impact of body weight and abdominal obesity in women and men with cardiovascular disease. *American heart journal*. 2005.

- [51] Diaz, V. A.; Mainous, A. G. 3.; Baker, R.; Carnemolla, M.; Majeed, A.: How does ethnicity affect the association between obesity and diabetes? *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2007.
- [52] Hartwig, S.; Kluttig, A.; Tiller, D.; Fricke, J.; Muller, G.; Schipf, S.; Volzke, H.; Schunk, M.; Meisinger, C.; Schienkiewitz, A., *et al.* Greiser, K. H.: Anthropometric markers and their association with incident type 2 diabetes mellitus: which marker is best for prediction? Pooled analysis of four German population-based cohort studies and comparison with a nationwide cohort study. *BMJ open*. 2016.
- [53] Perk, J.; Backer, G. de; Gohlke, H.; Graham, I.; Reiner, Z.; Verschuren, M.; Albus, C.; Benlian, P.; Boysen, G.; Cifkova, R., *et al.* Zannad, F.: European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *European heart journal*. 2012.
- [54] Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002.
- [55] Grundy, S. M.; Cleeman, J. I.; Merz, C. N. B.; Brewer, H. B., JR; Clark, L. T.; Hunnighake, D. B.; Pasternak, R. C.; Smith, S. C., JR; Stone, N. J.: Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*. 2004.
- [56] The German Cardiovascular Prevention Study (GCP): design and methods. GCP Study Group. *European heart journal*. 1988.
- [57] Scheidt-Nave, C.; Du, Y.; Knopf, H.; Schienkiewitz, A.; Ziese, T.; Nowossadeck, E.; Gosswald, A.; Busch, M. A.: Verbreitung von Fettstoffwechselstörungen bei Erwachsenen in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 2013.
- [58] Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V.
<http://www.dhs.de/datenfakten/alkohol.html>.
- [59] Mancia, G.; Fagard, R.; Narkiewicz, K.; Redón, J.; Zanchetti, A.; Böhm, M.; Christiaens, T.; Cifkova, R.; Backer, G. de; Dominiczak, A., *et al.* Zannad, F.: 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of hypertension*. 2013.

- [60] Renzi, P.; Ginns, L. C.: Analysis of T cell subsets in normal adults. Comparison of whole blood lysis technique to Ficoll-Hypaque separation by flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 1987.
- [61] Biomarkers and surrogate endpoints. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001.
- [62] Garg, P. K.; Arnold, A. M.; Hinckley Stukovsky, K. D.; Koro, C.; Jenny, N. S.; Mukamal, K. J.; Criqui, M. H.; Furberg, C. D.; Newman, A. B.; Cushman, M.: Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Incident Peripheral Arterial Disease in Older Adults. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2016.
- [63] Packard, C. J.; O'Reilly, D. S.; Caslake, M. J.; McMahon, A. D.; Ford, I.; Cooney, J.; Macphie, C. H.; Suckling, K. E.; Krishna, M.; Wilkinson, F. E., *et al.* Lowe, G. D.: Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *The New England journal of medicine*. 2000.
- [64] Yunoki, K.; Naruko, T.; Inaba, M.; Inoue, T.; Nakagawa, M.; Sugioka, K.; Ohsawa, M.; Iwasa, Y.; Komatsu, R.; Itoh, A., *et al.* Ueda, M.: Gender-specific correlation between plasma myeloperoxidase levels and serum high-density lipoprotein-associated paraoxonase-1 levels in patients with stable and unstable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2013.
- [65] Zhang, R.; Brennan, M. L.; Fu, X.; Aviles, R. J.; Pearce, G. L.; Penn, M. S.; Topol, E. J.; Sprecher, D. L.; Hazen, S. L.: Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*. 2001.
- [66] Lo, K.; Brinkman, R. R.; Gottardo, R.: Automated gating of flow cytometry data via robust model-based clustering. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2008.
- [67] Pyne, S.; Hu, X.; Wang, K.; Rossin, E.; Lin, T.-I.; Maier, L. M.; Baecher-Allan, C.; McLachlan, G. J.; Tamayo, P.; Hafler, D. A., *et al.* Mesirov, J. P.: Automated high-dimensional flow cytometric data analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009.
- [68] Jeffries, D.; Zaidi, I.; Jong, B. de; Holland, M. J.; Miles, D. J. C.: Analysis of flow cytometry data using an automatic processing tool. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2008.
- [69] Aghaeepour, N.; Finak, G.; Hoos, H.; Mosmann, T. R.; Brinkman, R.; Gottardo, R.; Scheuermann, R. H.: Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nature methods*. 2013.

- [70] Verschoor, C. P.; Lelic, A.; Bramson, J. L.; Bowdish, D. M. E.: An Introduction to Automated Flow Cytometry Gating Tools and Their Implementation. *Frontiers in immunology*. 2015.
- [71] Lehmacher, W.: *Verlaufskurven und Crossover*. Springer. 1987.
- [72] Streitz, M.; Miloud, T.; Kapinsky, M.; Reed, M. R.; Magari, R.; Geissler, E. K.; Hutchinson, J. A.; Vogt, K.; Schlickeiser, S.; Kverneland, A. H., *et al.* Sawitzki, B.: Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials. *Transplantation research*. 2013.
- [73] Sancho, D.; Gomez, M.; Sanchez-Madrid, F.: CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in immunology*. 2005.
- [74] Testi, R.; D'Ambrosio, D.; Maria, R. de; Santoni, A.: The CD69 receptor. *Immunology Today*. 1994.
- [75] Caruso, A.; Licenziati, S.; Corulli, M.; Canaris, A. D.; Francesco, M. A. de; Fiorentini, S.; Peroni, L.; Fallacara, F.; Dima, F.; Balsari, A., *et al.* Turano, A.: Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*. 1997.
- [76] Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M.; Toda, M.: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1995.
- [77] Seddiki, N.; Santner-Nanan, B.; Martinson, J.; Zaunders, J.; Sasson, S.; Landay, A.; Solomon, M.; Selby, W.; Alexander, S. I.; Nanan, R., *et al.* Fazekas de St Groth, B.: Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006.
- [78] Giorgi, J. V.; Lyles, R. H.; Matud, J. L.; Yamashita, T. E.; Mellors, J. W.; Hultin, L. E.; Jamieson, B. D.; Margolick, J. B.; Rinaldo, C. R., JR; Phair, J. P., *et al.* Detels, R.: Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2002.
- [79] Volk, H. D.; Reinke, P.; Docke, W. D.: Clinical aspects. *Chemical immunology*. 2000.
- [80] Bendelac, A.; Savage, P. B.; Teyton, L.: The biology of NKT cells. *Annual review of immunology*. 2007.
- [81] van Puijvelde, G. H. M.; Kuiper, J.: NKT cells in cardiovascular diseases. *European journal of pharmacology*. 2017.

- [82] Ziegler-Heitbrock, L.: Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. *Frontiers in immunology*. 2015.
- [83] Rogacev, K. S.; Cremers, B.; Zawada, A. M.; Seiler, S.; Binder, N.; Ege, P.; Große-Dunker, G.; Heisel, I.; Hornof, F.; Jeken, J., *et al.* Heine, G. H.: CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012.
- [84] Heine, G. H.; Ortiz, A.; Massy, Z. A.; Lindholm, B.; Wiecek, A.; Martínez-Castelao, A.; Covic, A.; Goldsmith, D.; Süleymanlar, G.; London, G. M., *et al.* Fliser, D.: Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nature reviews. Nephrology*. 2012.
- [85] Seidler, S.; Zimmermann, H. W.; Bartneck, M.; Trautwein, C.; Tacke, F.: Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC immunology*. 2010.
- [86] Jentsch-Ullrich, K.; Koenigsmann, M.; Mohren, M.; Franke, A.: Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*. 2005.
- [87] Tollerud, D. J.; Clark, J. W.; Brown, L. M.; Neuland, C. Y.; Pankiw-Trost, L. K.; Blattner, W. A.; Hoover, R. N.: The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy nonsmokers. *Journal of clinical immunology*. 1989.
- [88] Rovati, B.; Mariucci, S.; Poma, R.; Tinelli, C.; Delfanti, S.; Pedrazzoli, P.: An eight-colour flow cytometric method for the detection of reference values of lymphocyte subsets in selected healthy donors. *Clinical and experimental medicine*. 2014.
- [89] Li, J.; Chen, Q.; Luo, X.; Hong, J.; Pan, K.; Lin, X.; Liu, X.; Zhou, L.; Wang, H.; Xu, Y., *et al.* Duan, C.: Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Positively Correlates to Age in Healthy Population. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2015.
- [90] Al-Sufyani, A. A.; Mahassni, S. H.: Obesity and immune cells in Saudi females. *Innate immunity*. 2011.
- [91] Koca, T. T.: Does obesity cause chronic inflammation? The association between complete blood parameters with body mass index and fasting glucose. *Pakistan journal of medical sciences*. 2017.
- [92] Ilavska, S.; Horvathova, M.; Szabova, M.; Nemessanyi, T.; Jahnova, E.; Tulinska, J.; Liskova, A.; Wsolova, L.; Staruchova, M.; Volkovova, K.: Association between the human immune response and body mass index. *Human immunology*. 2012.

- [93] Vuong, J.; Qiu, Y.; La, M.; Clarke, G.; Swinkels, D. W.; Cembrowski, G.: Reference intervals of complete blood count constituents are highly correlated to waist circumference: should obese patients have their own "normal values?". *American journal of hematology*. 2014.
- [94] Shimokata, H.; Tobin, J. D.; Muller, D. C.; Elahi, D.; Coon, P. J.; Andres, R.: Studies in the distribution of body fat. *Journal of gerontology*. 1989.
- [95] Pi-Sunyer, F. X.: Medical hazards of obesity. *Annals of Internal Medicine*. 1993.
- [96] Su, B.-Y.; Tian, C.-F.; Gao, B.-L.; Tong, Y.-H.; Zhao, X.-H.; Zheng, Y.: Correlation of the leucocyte count with traditional and non-traditional components of metabolic syndrome. *Postgraduate medicine*. 2016.
- [97] Barreira, J. C. M.; Costa, R.; Pombo, M. G.; Ferreira, I. C. F. R.: Intersubject variability of blood analysis reference values: assessment of age and locality influence by means of a linear discriminant analysis model. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2013.
- [98] Howard, G.; Wagenknecht, L. E.; Burke, G. L.; Diez-Roux, A.; Evans, G. W.; McGovern, P.; Nieto, F. J.; Tell, G. S.: Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *JAMA*. 1998.
- [99] Tanaka, H.; Safar, M. E.: Influence of lifestyle modification on arterial stiffness and wave reflections. *American journal of hypertension*. 2005.
- [100] Schiel, R.; Franke, S.; Busch, M.; Müller, A.; Fleck, C.; Müller, U. A.; Braun, A.; Stein, G.: Effect of smoking on risk factors for cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus and renal insufficiency. *European journal of medical research*. 2003.
- [101] Capuano, V.; Lamaida, N.; Martino, M. de; Mazzotta, G.: Association between white blood cell count and risk factors of coronary artery disease. *Giornale italiano di cardiologia*. 1995.
- [102] Freedman, D. S.; Joesoef, M. R.; Barboriak, J. J.; Stallone, D. D.; Byers, T.: Correlates of leukocyte counts in men. *Annals of epidemiology*. 1996.
- [103] Moszczyński, P.; Zabiński, Z.; Rutowski, J.; Słowiński, S.; Tabarowski, Z.: Immunological findings in cigarette smokers. *Toxicology letters*. 2001.
- [104] Higuchi, T.; Omata, F.; Tsuchihashi, K.; Higashioka, K.; Koyamada, R.; Okada, S.: Current cigarette smoking is a reversible cause of elevated white blood cell count: Cross-sectional and longitudinal studies. *Preventive medicine reports*. 2016.

- [105] Klatsky, A. L.; Armstrong, M. A.; Friedman, G. D.: Risk of cardiovascular mortality in alcohol drinkers, ex-drinkers and nondrinkers. *The American journal of cardiology*. 1990.
- [106] Chryschoou, C.; Panagiotakos, D. B.; Pitsavos, C.; Skoumas, J.; Toutouza, M.; Papaioannou, I.; Toutouzas, P. K.; Stefanadis, C.: Effects of chronic alcohol consumption on lipid levels, inflammatory and haemostatic factors in the general population: the 'ATTICA' Study. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*. 2003.
- [107] Imhof, A.; Froehlich, M.; Brenner, H.; Boeing, H.; Pepys, M. B.; Koenig, W.: Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *The Lancet*. 2001.
- [108] Zuluaga, P.; Sanvisens, A.; Teniente, A.; Fuster, D.; Tor, J.; Martinez-Caceres, E.; Muga, R.: Wide array of T-cell subpopulation alterations in patients with alcohol use disorders. *Drug and alcohol dependence*. 2016.
- [109] Romeo, J.; Warnberg, J.; Nova, E.; Diaz, L. E.; Gonzalez-Gross, M.; Marcos, A.: Changes in the immune system after moderate beer consumption. *Annals of nutrition & metabolism*. 2007.
- [110] Laso, F. J.; Madruga, J. I.; Lopez, A.; Ciudad, J.; Alvarez-Mon, M.; San Miguel, J.; Orfao, A.: Distribution of peripheral blood lymphoid subsets in alcoholic liver cirrhosis. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1996.
- [111] Belen, E.; Sungur, A.; Sungur, M. A.; Erdoğan, G.: Increased Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Patients With Resistant Hypertension. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)*. 2015.
- [112] Wang, H.-y.; Dai, Y.; Wang, J.-l.; Yang, X.-y.; Jiang, X.-g.: Anti-CD69 monoclonal antibody treatment inhibits airway inflammation in a mouse model of asthma. *Journal of Zhejiang University. Science. B*. 2015.

Anlagen

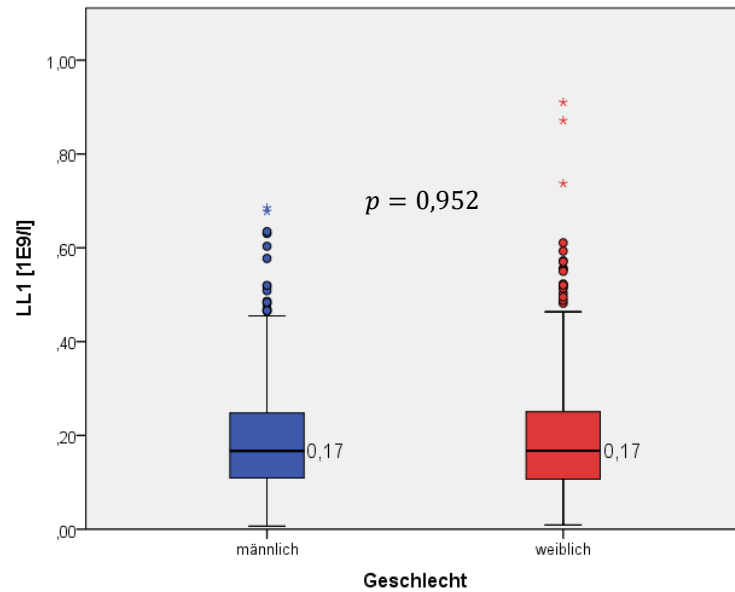


Abbildung 25: Boxplot der absoluten Zellzahlen der Lymphozyten-ähnlichen Zellen 1 (CD3⁺ CD16/56⁺) getrennt nach Geschlecht mit Angabe der Mediane als Lagemaß. n (männlich) = 404; n (weiblich) = 465.

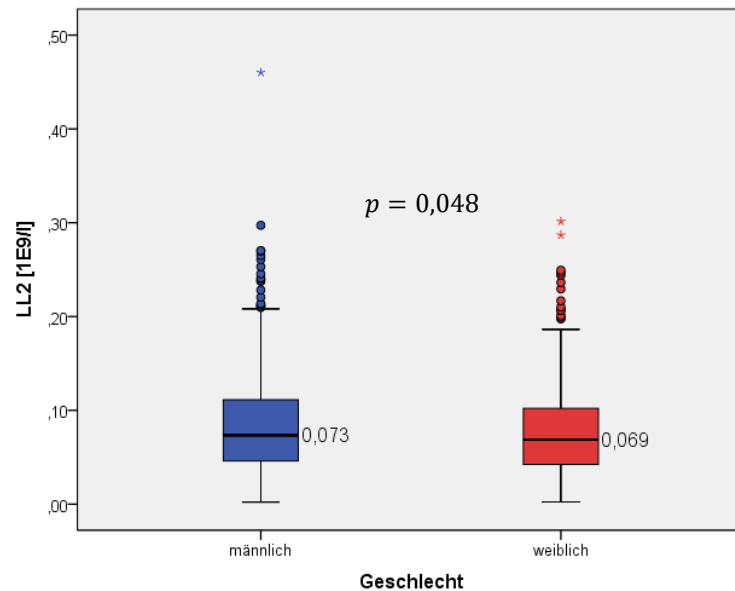


Abbildung 26: Boxplot der absoluten Zellzahlen der Lymphozyten-ähnlichen Zellen 2 (CD8⁺ CD4⁻) getrennt nach Geschlecht mit Angabe der Mediane als Lagemaß. n (männlich) = 404; n (weiblich) = 465.

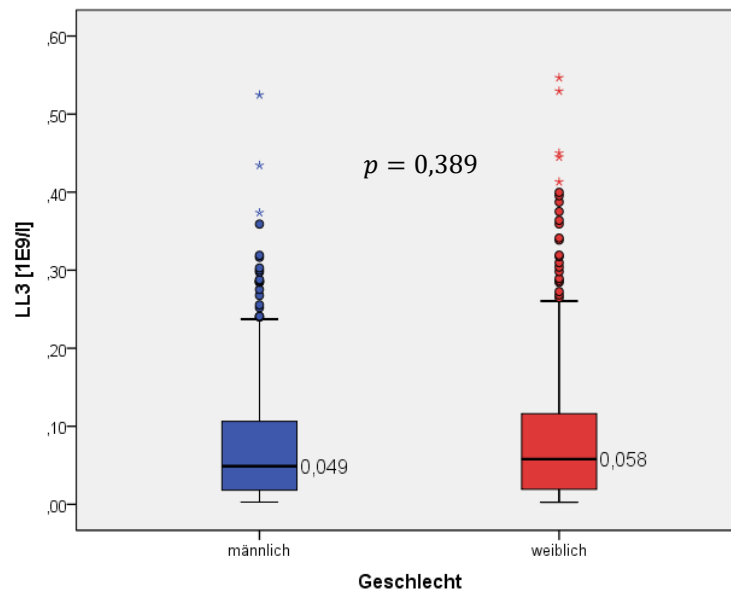


Abbildung 27: Boxplot der absoluten Zellzahlen der Lymphozyten-ähnlichen Zellen 3 (CD4⁺ CD8⁻) getrennt nach Geschlecht mit Angabe der Mediane als Lagemaß. n (männlich) = 403; n (weiblich) = 465.

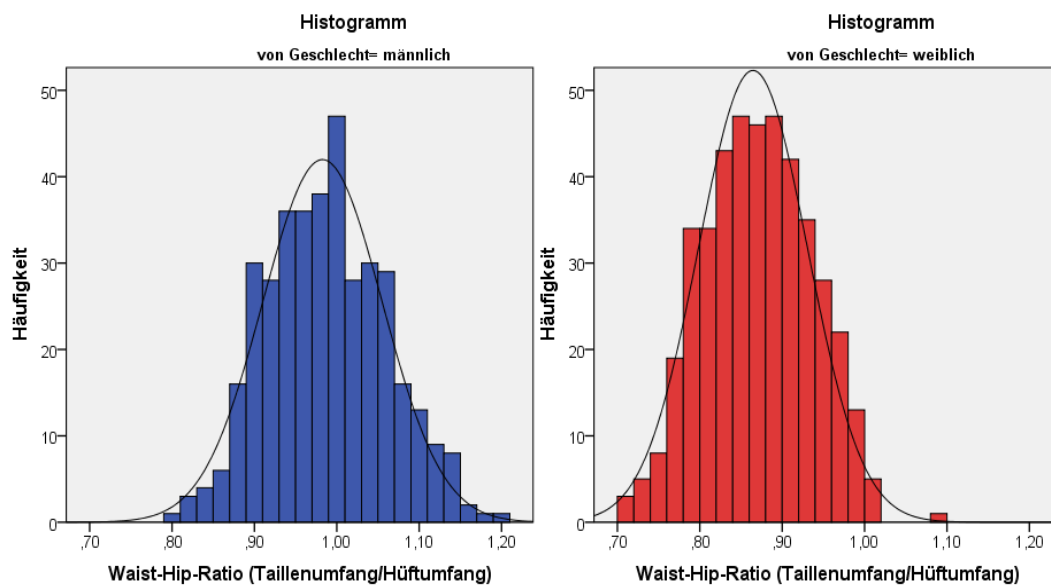


Abbildung 28: Darstellung der Verteilung der WHR von 382 männlichen (blau) und 434 weiblichen (rot) Probanden mit Einzeichnung der Normalverteilungskurve. Mittelwert \pm Standardabweichung für Männer: $0,98 \pm 0,073$ und für Frauen: $0,86 \pm 0,066$.

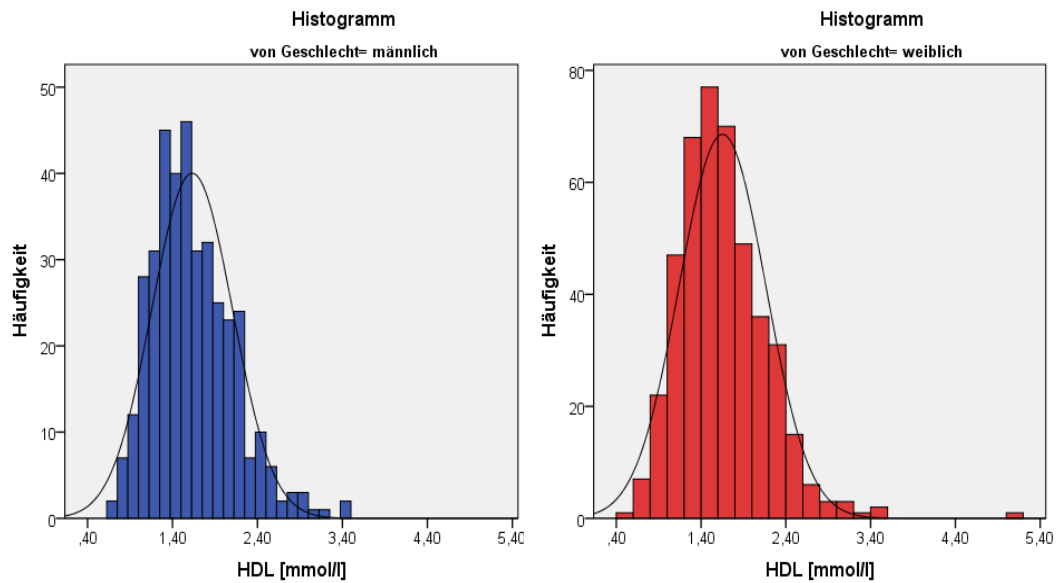


Abbildung 29: Darstellung der Verteilung des HDL-Wertes von 381 männlichen (blau) und 439 weiblichen (rot) Probanden mit Einzeichnung der Normalverteilungskurve. Mittelwert \pm Standardabweichung für Männer: $1,63 \pm 0,48$ mmol/l und für Frauen: $1,65 \pm 0,51$ mmol/l.

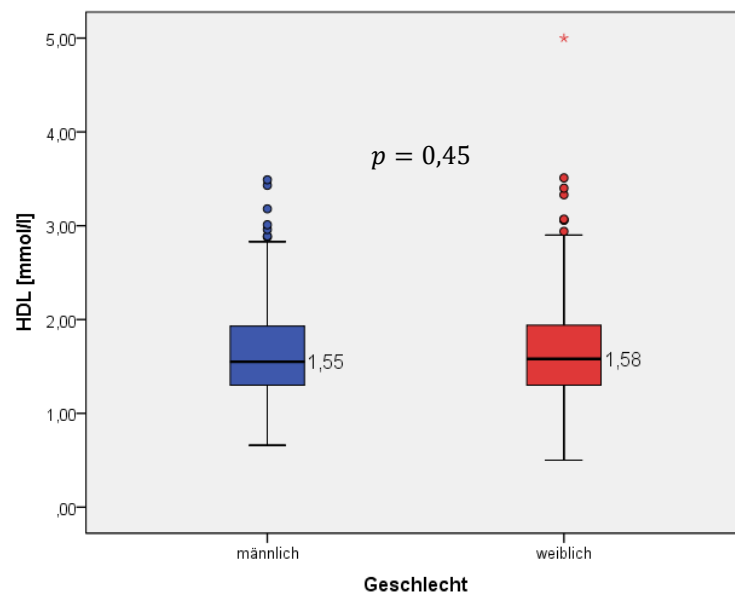


Abbildung 30: Boxplot des HDL-Wertes getrennt nach Geschlecht mit Angabe der Mediane als Lagemaß. p berechnet mittels t -Test für unabhängige Stichproben bei hinreichender Normalverteilung.

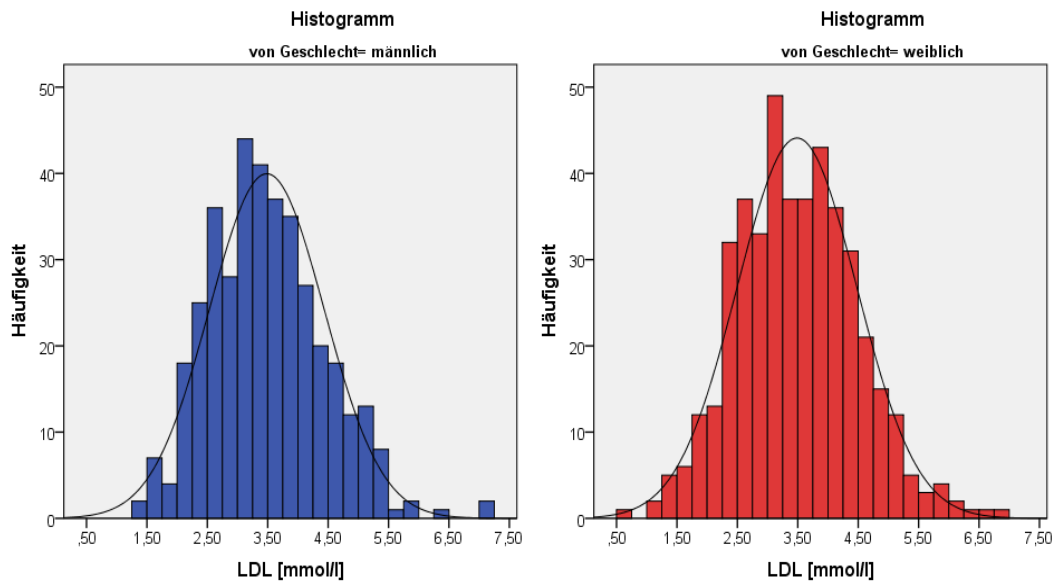


Abbildung 31: Darstellung der Verteilung des LDL-Wertes von 381 männlichen (blau) und 439 weiblichen (rot) Probanden mit Einzeichnung der Normalverteilungskurve. Mittelwert \pm Standardabweichung für Männer: $3,48 \pm 0,95$ mmol/l und für Frauen: $3,49 \pm 0,99$ mmol/l.

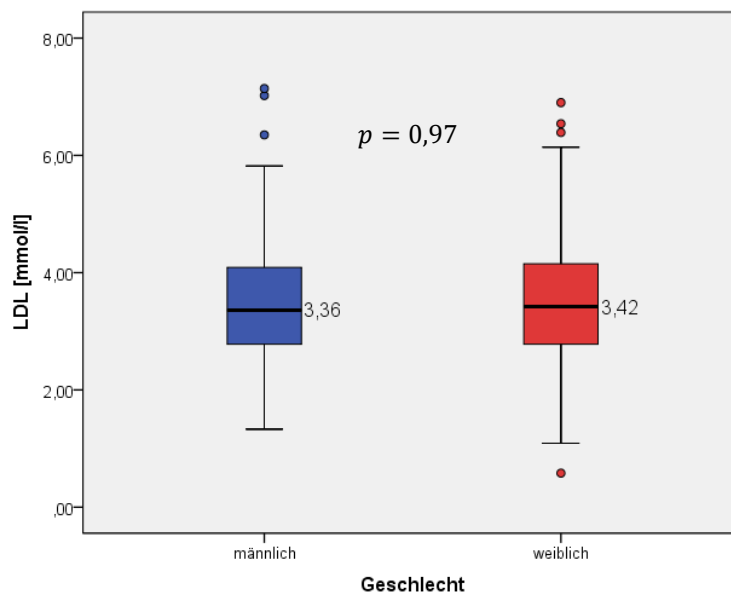


Abbildung 32: Boxplot des LDL-Wertes getrennt nach Geschlecht mit Angabe der Mediane als Lagemaß. p berechnet mittels t -Test für unabhängige Stichproben bei hinreichender Normalverteilung.

Tabelle 23: Auflistung der Korrelationskoeffizienten mit 95 % Konfidenzintervall bezüglich des Zusammenhangs zwischen den Cholesterolverten und WHR (*n*) Grundgesamtheit für das jeweilige Geschlecht.

	Männlich			weiblich		
Cholesterin	<i>n</i>	Korrelation nach Pearson	95 % Konfidenzintervall mittels Bootstrap*	<i>n</i>	Korrelation nach Pearson	95 % Konfidenzintervall mittels Bootstrap*
HDL	360	0,029	[-0,067; 0,131]	409	-0,061	[-0,153; 0,022]
LDL	360	0,058	[-0,037; 0,152]	409	-0,044	[-0,139; 0,054]

* Bootstrap-Ergebnisse mit Hilfe von 1000 Bootstrap Stichproben

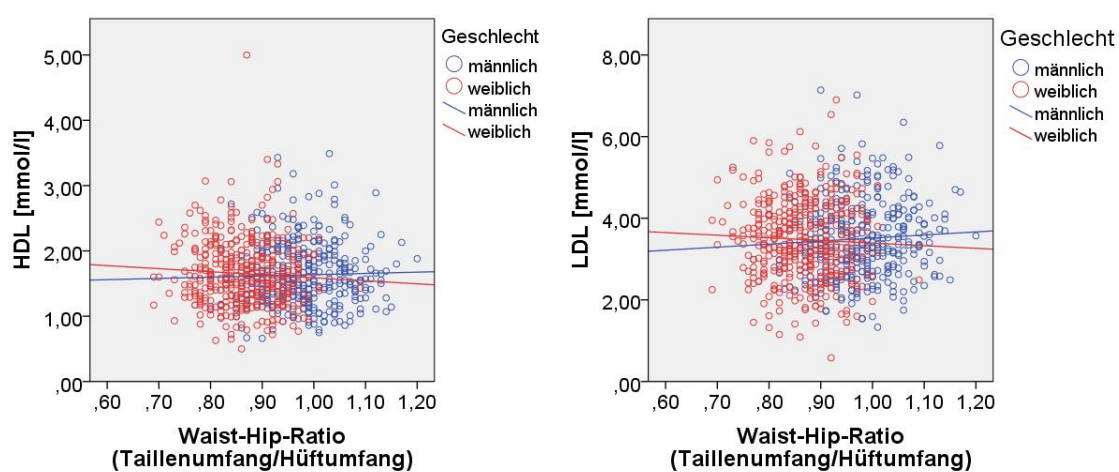


Abbildung 33: Darstellung der Abhängigkeit des HDL-Wertes bzw. LDL-Wertes von der WHR mit hinzugefügter linearer Regressionsgeraden getrennt nach Geschlecht.

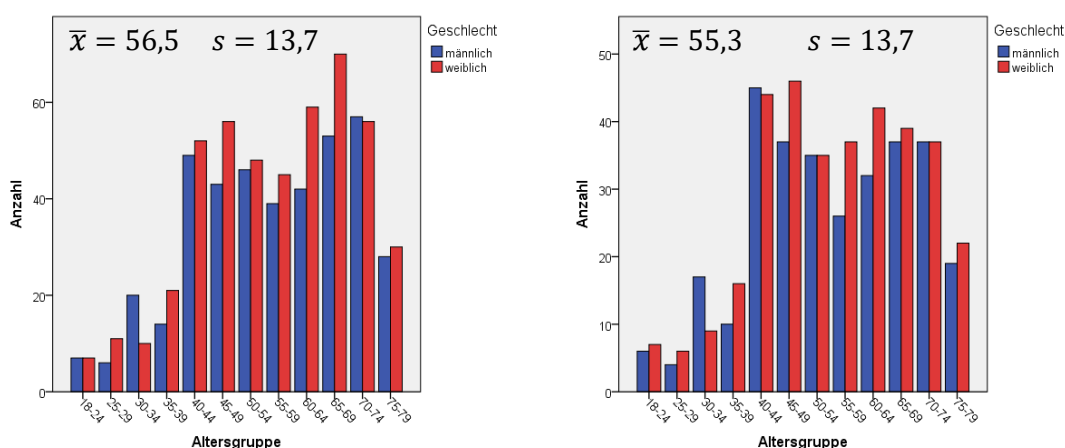


Abbildung 34: Vergleich der Altersverteilung aller 869 eingeschlossener Probanden (links) mit der, aller 645 Probanden mit Angaben bezüglich des Merkmals Hypertonie (rechts). (\bar{x}) Mittelwert (s) Standardabweichung.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. An dieser Stelle möchte ich nochmals darauf hinweisen, dass die Abnahme, die Präparation sowie die durchflusszytometrische Messung der Blutproben von Dritten vorgenommen wurden. Das manuelle Gating, die statistische Auswertung der Ergebnisse sowie die Erstellung dieser Monografie habe ich selbstständig und ohne unzulässige Hilfe durchgeführt. Es wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....

Datum

.....

Unterschrift

Lebenslauf

Marlene Kautzner	Geburtsdatum: 13.01.1993 in Annaberg-Buchholz
Lipsiusstraße 38	Mobil: 0176 956 05 797
04317 Leipzig	E-Mail: marlene.kautzner@gmx.de

Klinische Erfahrungen

07/2017 – 10/2017	PJ Dermatologie, Universitätsklinikum Leipzig
05/2017 – 06/2017	PJ Chirurgie, Bristol Royal Infirmary, Großbritannien
03/2017 – 04/2017	PJ Chirurgie, Klinikum St. Georg Leipzig
11/2016 – 02/2017	PJ Innere Medizin, St. Elisabeth-Krankenhaus Leipzig
2014 – 2016	4 Monate Famulatur, St. Elisabeth-Krankenhaus Leipzig, EKA Erzgebirgsklinikum Annaberg gGmbH, Universitätsklinikum Leipzig, HELIOS Park-Klinikum Leipzig, Praxis Dr. Falkenhahn, Leipzig
09/2015 – 10/2015	Volunteering für Zlatni Cekin, Zentrum für Rehabilitation und Erziehung von behinderten Kindern, Slavonski Brod, Kroatien

Schul- und Hochschulbildung

10/2014 – 02/2018	Promotion, Herzzentrum Leipzig, Kinderkardiologie, Forschung & Lehre Beitrag auf Internationaler Konferenz 02/2017: Photonics West, SPIE, San Francisco, USA
01/2018	Approbation als Ärztin
10/2011 – 12/2017	Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig 1. Staatsexamen 08/2013, Note 2 2. Staatsexamen 10/2016 und 12/2017, Note 2
2003 – 2011	Abitur, Landkreisgymnasium St. Annen, Annaberg-Buchholz, Gesamtnote 1,3

Sonstiges

Sprachen	Deutsch, Englisch, Französisch
10/2015 – 03/2016	Teilnahme am Kurs „Internistischer Ultraschall, Vorlesung mit praktischen Übungen“, LernKlinik Leipzig, Universitätsklinikum Leipzig
10/2013 – 09/2014	Teilnahme am Kurs „Englisch für Mediziner“, Universität Leipzig

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich während meiner Dissertation unterstützt und motiviert haben.

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Attila Tárnok für die Vergabe der Promotion und dem damit verbundenen Vertrauen in mich. Ich möchte mich für die besondere Unterstützung und die investierte Zeit während zahlreicher Treffen bedanken, die mir trotz des vollen Terminkalenders ermöglicht wurden.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Markus Löffler für die freundliche Übernahme der Mitbetreuung der vorliegenden Dissertation.

Meiner Betreuerin Dr. Susanne Melzer möchte ich für die durchgehend sehr gute Betreuung danken. Von ihr konnte ich alles über die Durchflusszytometrie und das Gating lernen und die gemeinsamen Stunden im Büro füllten so manchen langen Nachmittag mit guter Laune. Ich möchte mich für das geduldige und vor allem unfassbar schnelle Beantworten aller Fragen bedanken und für die Anregungen zu meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich Dr. Matthias Horn für die Hilfestellung in statistischen Fragestellungen und darüber hinaus für seine Unterstützung danken.

Ich bedanke mich beim kompletten LIFE-Team für die gute Kooperation, die bereitgestellten Daten sowie die Probenabnahme und Analyse. Natürlich danke ich auch allen LIFE-Probanden, die sich freiwillig für den Fortschritt in der Medizin einigen Prozeduren unterziehen mussten und ohne die meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt und in all meinen Entscheidungen bestärkt haben. Danke auch an meine Freunde und Kommilitonen für eine wunderschöne Studienzeit und das Beraten in schwierigen Momenten.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund Martin Fränzl danken, der mich in meiner gesamten Studien- und Promotionszeit unglaublich unterstützt hat. Ohne seine Motivation und Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die Kraft und deine Liebe.